



Nanoparticules et rayonnement synchrotron pour le traitement des tumeurs cérébrales

Florence Taupin

► To cite this version:

Florence Taupin. Nanoparticules et rayonnement synchrotron pour le traitement des tumeurs cérébrales. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS021 . tel-00949136

HAL Id: tel-00949136

<https://theses.hal.science/tel-00949136>

Submitted on 19 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la médecine, la biologie et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Florence TAUPIN

Thèse dirigée par **Hélène ELLEAUME**
et codirigée par **Jean-Luc RAVANAT**

préparée au sein de l'**Institut des Neurosciences de Grenoble**
et de l'**Ecole Doctorale pour l'Ingénierie, la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Nanoparticules et Rayonnement Synchrotron pour le Traitement des Tumeurs Cérébrales

Thèse soutenue publiquement le **10 Juillet 2013**,
devant le jury composé de :

Mr, Benoit PAQUETTE

Professeur, Université de Sherbrooke, Dpt. Médecine Nucléaire et Radiobiologie,
Rapporteur

Mr, Philippe MORETTO

Professeur, Université de Bordeaux 1, CENBG, Rapporteur

Mr, Pascal PERRIAT

Professeur, Université de Lyon, MATEIS, Examineur

Mr, Jacques BALOSSO

Professeur, Université de Grenoble, CHU Grenoble, Examineur

Mme, Hélène ELLEAUME

Directeur de Recherche, INSERM U836, GIN Grenoble, Directeur de thèse

Mr, Jean-Luc RAVANAT

Directeur de Recherche, CEA Grenoble, LAN, Co-Directeur de thèse



"Le succès, c'est d'aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme."
Winston Churchill
(1874-1965)

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Benoît Paquette, de l'Université de Sherbrook et Philippe Moretto, de l'université de Bordeaux, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Pascal Perriat et Jacques Balosso pour en avoir été des examinateurs concernés. A vous tous, vous avez donné de la valeur à ce projet, qui me permet de le conclure joliment.

Ce travail n'aurait bien sûr pas été possible sans Hélène et Jean-Luc. Quel beau duo vous formez ! Un grand merci à tous les deux pour la qualité de votre encadrement. Merci Hélène de m'avoir rapidement fait confiance, en me proposant ce projet tout d'abord et en me laissant le mener comme tu l'as fait, ensuite. Je suis admirative de la façon dont tu affrontes les épreuves et extrêmement fière de venir compléter la liste de tes étudiant(e)s. Merci Jean-Luc pour ta gestion de la pluridisciplinarité et ta patience vis à vis de mes (graves) lacunes en chimie. Merci aussi pour l'ouverture que tu as pu me donner sur le monde scientifique. Je n'oublierais pas nos congrès en commun qui restent pour moi des moments marquants. Je vous souhaite à tous les deux, une encore longue collaboration. Vous faites ça avec *brio*.

L'encadrement d'une thèse ne se cantonne parfois pas à ses directeurs. Mélanie, un grand merci pour... TOUT... Une grande partie de cette thèse te revient. Merci pour ton aide et tes conseils précieux. Merci pour ta bonne humeur inébranlable qui nous a plus d'une fois permis de décompresser, toi, moi et les rats aussi parfois. Merci pour ton écoute sans laquelle ces trois années auraient certainement été beaucoup plus dures. En bref, je remercie la collègue mais aussi et surtout l'amie que tu es devenue pour moi.

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe siX (prononcez le X, c'est important) de l'Institut des Neurosciences de Grenoble et à ce titre, je voudrais en remercier son chef, François, pour son accueil et sa sincérité que j'apprécie très particulièrement. Mais aussi les "sous-chefs" et les "pas chefs" du tout (mais non moins importants) qui ont largement contribué aux bons souvenirs de ces trois années que j'emporte avec moi. Ainsi donc, merci Jeff, Raph, Sylvain, Anne-Marie, Laure, Magali, Pierre, Mathias, David, Layal, Maïte, Lorianne, Corentin, Fanny, Loïc, Julien, Marine, Paul, Laurie... La place me manque pour mettre noir sur blanc la pensée toute particulière que j'ai pour chacun d'entre vous mais il n'y a pas une seule fois où je suis venue à reculons au labo, et ça, je vous le dois certainement !

Pour moi, les collègues s'étendent à l'ensemble d'ID17, que je voudrais remercier pour ces belles années d'échanges et de joyeuse cohabitation. Petite pensée particulière pour Thierry : merci d'avoir eu réponse (avec le sourire) à toutes mes questions, merci pour ta patience devant mes problèmes

informatiques (existentiels, précisons le), merci pour avoir été un *local contact* hors pair et bien sûr pour nos séances piscine ou vélo plus que nécessaires à certains moments. Un grand merci aussi à Manu. Ça change la vie d’avoir un voisin informaticien, et encore plus quand il anime le couloir 17.5 de ses choix musicaux. Merci aussi Nem et Elke pour votre sympathie et vos accents (différents, certes) mais qui doivent tous deux continuer à chanter sur ID17. Un grand merci bien sûr à Chacha, Céline et Hélène pour votre aide précieuse dans les labos ! Merci aussi Erminia, pour nos soirées de “rédaction/discussion” communes et pour les quelques rudiments d’italien : Forza e Coraggio Bella ! Merci enfin à Ludo et Paulette pour prendre la relève avec enthousiasme. On compte sur vous !

Les collaborations scientifiques n’ont pas manqué dans ce travail et j’aimerais remercier les nombreuses personnes qui m’ont ouvert les portes de leur labo ou tout simplement pris le temps de m’aider quand j’en ai eu besoin. Un grand merci donc à Rachel et Mathieu (Agelou) du CEA de Saclay, pour avoir élargi le sujet et mis la main à la patte, toujours dans la bonne humeur ! Je remercie également le LAN, pour son accueil chaleureux, les réponses à mes questions (bêtes) de bio-chimie et bien sûr, les pauses café incontournables ! Merci aussi à l’équipe 5 du GIN pour son aide précieuse sur la plateforme IRM et en histologie notamment. Merci à Jean-François Mayol du CRSSA pour m’avoir fait découvrir l’art de la cytométrie. Merci à Josiane Arnaud du CHU de Grenoble pour mes (trop) nombreux dosages par ICP. Mes remerciements vont également aux lyonnais, pour nous avoir fourni les nanoparticules de gadolinium et aidé à trouver des solutions pour les imager ! A Boris Kysela de l’université de Birmingham, pour notre projet commun sur les nanoparticules d’or et de platine. Et encore à nos voisins d’ID19 et d’ID22 pour m’avoir permis de découvrir d’autres lignes et techniques d’imagerie synchrotron. Grâce à vous tous, le terme de pluridisciplinarité a pris un sens très concret pour moi. J’ai été sincèrement touchée par la disponibilité que chacun a bien voulu m’accorder.

Je voudrais remercier également mes collègues enseignants que j’ai rencontrés au cours de mon activité de monitorat. La liste est une fois encore assez longue. Vos exemples réunis m’ont permis d’aborder le métier d’enseignant chercheur (un peu) plus facilement. J’ai bien sûr une pensée particulière pour Yannick Arnoud qui m’a donné un beau modèle de pédagogie. Merci pour ton aide dans la recherche des enseignements et tes conseils pour les donner !

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes extérieures à ce travail mais tout autant importantes pour moi. Merci à ma famille et mes parents notamment, pour leur soutien dans cette aventure, et bien sûr dans tout ce qui a précédé et tout ce qui suivra ! Je sais que je peux compter sur vous et c’est important ! Merci aussi à ma belle famille, pour votre gentillesse et votre bonne humeur qui ont égayé nos pauses boulot du weekend. Je remercie également les copains, pour avoir fortement humanisé Grenoble à mes yeux : merci Julia, Moun, Adrien, Tom, Manu, Ju, Pierrot, Mathieu, Alex, Fab, Tib, Jeanne, Fatfat, Julien, Margott’, Isa et bien sûr, nombreux de mes collègues qui sont devenus des amis.

Enfin, *last but not least*, je remercie Nico. Comme tu l’as dit toi-même, je n’ai pas besoin de te dire pourquoi, tu comprends tout. Merci d’avoir tout compris tout le temps pendant ces trois années, merci de m’avoir écoutée, de m’avoir conseillée. Merci pour ta manière bien à toi de me donner confiance. Finalement, marcherait-elle ? ! Je ne sais pas si t’agagnéalalotrix, mais moi, je pense bien l’avoir fait !

Table des matières

Introduction générale	1
I État de l’art & problématique	5
1 Gliomes et options thérapeutiques	7
1.1 Épidémiologie et classification des tumeurs cérébrales gliales	8
1.1.1 Épidémiologie des tumeurs cérébrales	8
1.1.2 Classification des gliomes	8
1.2 Le cerveau, environnement des tumeurs cérébrales	10
1.2.1 Architecture du système nerveux	10
1.2.2 Vascularisation cérébrale	10
1.2.3 Angiogénèse et néoangiogénèse	12
1.2.4 Rupture de la barrière hémato-encéphalique	12
1.2.5 Effet EPR (<i>Enhanced Permeability and Retention</i>)	13
1.2.6 <i>Convection-Enhanced Delivery</i>	13
1.3 Les options thérapeutiques et leurs limites	15
1.3.1 Options thérapeutiques	15
1.3.2 Traitement conventionnel	16
1.3.3 Optimiser la radiothérapie externe	17
2 Conséquences biologiques d’une irradiation de photons	25
2.1 Interaction des photons dans la matière	26
2.1.1 Processus d’interaction des photons	27
2.1.2 Section efficace	28
2.1.3 Coefficients d’atténuation linéique et massique	29
2.2 Les électrons, vecteurs du dépôt d’énergie	31
2.2.1 Origine des électrons émis	31
2.2.2 Pouvoir d’arrêt	31
2.2.3 Transfert d’énergie linéique	32

2.3	Du dépôt d'énergie aux dommages biologiques	34
2.3.1	Quelques notions de dosimétrie	34
2.3.2	De l'importance de la microdosimétrie	34
2.3.3	Les dommages radio-induits	36
2.3.4	Survie clonogénique	39
3	Le synchrotron pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs cérébrales	45
3.1	Rayonnement synchrotron et ligne biomédicale	46
3.1.1	Production du rayonnement synchrotron	46
3.1.2	La ligne biomédicale (ID17)	47
3.2	Tomographie par rayonnement synchrotron	48
3.2.1	Principe de la tomographie X	49
3.2.2	Reconstruction des images par rétroprojection filtrée	50
3.2.3	Les spécificités liées au rayonnement synchrotron	52
3.3	Radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron	54
3.3.1	Principe et origine	54
3.3.2	Évolution vers la radiothérapie synchrotron	57
4	Les nanoparticules pour potentialiser la radiothérapie synchrotron	61
4.1	Motivations : une efficacité thérapeutique observée <i>in vivo</i>	62
4.1.1	Études sur des modèles de tumeurs sous-cutanées	62
4.1.2	Études sur des modèles de tumeurs intracérébrales	64
4.2	Les mécanismes observés à l'échelle de la cellule	66
4.2.1	Toxicité des nanoparticules	66
4.2.2	Internalisation des nanoparticules	67
4.2.3	Réponse cellulaire à une irradiation en présence de nanoparticules	70
4.3	Des explications recherchées à l'échelle moléculaire	72
4.3.1	Hétérogénéité du dépôt de dose	72
4.3.2	Les conséquences à l'échelle tumorale	73
	Problématique	75
II	Toxicité et internalisation des nanoparticules	79
5	Le modèle expérimental	81
5.1	Gliome F98	82
5.1.1	Modèle cellulaire	82

5.1.2	Modèle tumoral	82
5.2	Les nanoparticules de gadolinium (GdNPs)	83
5.3	Les nanoparticules d'or et de platine (AuNPs - PtNPs)	85
6	Méthodes expérimentales liées à la toxicité et l'internalisation des NPs	87
6.1	Analyse des données pour les expériences de biologie	88
6.1.1	Incertitudes de mesures et propagation des erreurs	88
6.1.2	Tests statistiques	88
6.1.3	Ajustement des données	91
6.2	Exposition des cellules F98 aux nanoparticules	92
6.2.1	Culture cellulaire	92
6.2.2	Incubation en présence des nanoparticules	93
6.3	Toxicité des nanoparticules <i>in vitro</i>	93
6.3.1	Survie cellulaire	93
6.3.2	Prolifération cellulaire	94
6.3.3	Cycle cellulaire	94
6.4	Internalisation des nanoparticules par les cellules F98	95
6.4.1	<i>Ion Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i>	95
6.4.2	Microscopie à fluorescence	96
6.5	Injection directe des nanoparticules <i>in vivo</i>	99
7	Réponse des cellules F98 exposées aux nanoparticules	101
7.1	Exposition des cellules F98 aux nanoparticules de gadolinium	102
7.1.1	Effet sur la survie cellulaire	102
7.1.2	Influence sur la prolifération cellulaire	103
7.1.3	Perturbation du cycle cellulaire	104
7.1.4	Internalisation des GdNPs par les cellules F98	105
7.2	Exposition des cellules F98 aux nanoparticules d'or et de platine	109
7.2.1	Concentration d'incubation	109
7.2.2	Effet sur la survie cellulaire	110
7.2.3	Perturbation du cycle cellulaire	111
7.2.4	Internalisation des Au/Pt NPs par les cellules F98	113
7.3	Toxicité des nanoparticules <i>in vivo</i>	117
7.4	Conclusion	117

III	Potentiel des nanoparticules pour la radiosensibilisation tumorale	123
8	Photoactivation des nanoparticules : simulations aux échelles macroscopique et microscopique.	125
8.1	Simulations macroscopiques du dépôt de dose	126
8.1.1	Code de simulation MCNPX :	126
8.1.2	Augmentation de dose macroscopique	128
8.1.3	Cas homogène : conséquences à l'échelle de la cellule	128
8.2	Évènements à l'échelle d'une nanoparticule	132
8.2.1	Spectres d'électrons issus d'une nanoparticule	132
8.2.2	Dépendance énergétique du facteur d'augmentation de dose local	136
8.2.3	Prise en compte des NPs : conséquences à l'échelle de la cellule	137
8.3	Objectifs de l'étude	138
9	Méthodes expérimentales pour mesurer l'augmentation de la radiotoxicité	141
9.1	Mesure de la production de radicaux libres OH^\bullet	142
9.2	Survie cellulaire et augmentation de la radiotoxicité	143
9.2.1	Les différentes sources de photons	143
9.2.2	Irradiation des cellules	144
9.2.3	Analyse de la survie cellulaire	147
9.3	Essais pré-cliniques	148
9.3.1	Inoculation des tumeurs cérébrales	148
9.3.2	Traitement des animaux	148
9.3.3	Analyse de la survie animale	150
10	Nanoparticules et rayons X : Réponses cellulaire et tumorale	153
10.1	Combinaison d'un agent de contraste à une irradiation X	154
10.1.1	Dosimétrie par mesure des radicaux libres OH^\bullet	154
10.1.2	Effet sur la survie cellulaire	156
10.2	Radiosensibilisation des cellules F98 par les NPs de gadolinium	159
10.2.1	Toxicité du gadolinium libre	160
10.2.2	Dépendance de la radiotoxicité en fonction de la dose de rayons X	160
10.2.3	Dépendance de la radiotoxicité en fonction de l'énergie des rayons X	162
10.3	Radiosensibilisation des cellules F98 par les NPs d'or et de platine	165
10.3.1	Réponse cellulaire	166
10.3.2	Réponse tumorale	169
10.4	Conclusion	171

IV	Imagerie des nanoparticules injectées localement dans un gliome	173
11	Tomographie X à deux énergies : principe et intérêts	175
11.1	La tomographie à deux énergies	177
11.1.1	Origine de la méthode	177
11.1.2	Application pour la décomposition d'un mélange d'éléments	179
11.2	Vers une application médicale	182
11.3	Conclusion et problématique	184
12	Méthodes expérimentales pour l'imagerie d'éléments lourds dans un gliome	187
12.1	Tomographie à deux énergies	188
12.1.1	Set-up expérimental	188
12.1.2	Algorithme de séparation des éléments	189
12.1.3	Couple d'énergies optimales et limite de détection	191
12.1.4	Études sur fantômes	195
12.1.5	Etudes <i>in vivo</i>	197
12.2	Caractérisation du volume tumoral	198
12.2.1	Imagerie des tumeurs <i>in vivo</i>	199
12.2.2	Imagerie des tumeurs <i>post-mortem</i>	200
13	Caractérisation de la distribution des nanoparticules dans un gliome	207
13.1	Tomographie à deux énergies : optimisation	208
13.1.1	Énergies optimales	208
13.1.2	Mesures sur fantômes	209
13.2	Application à l'imagerie d'un AC et de NPs chez le petit animal	213
13.2.1	Simulations	213
13.2.2	Imagerie <i>in vivo</i>	214
13.3	Comparaison de la prise de contraste au volume tumoral réel	217
13.3.1	Prise de contraste iodé	218
13.3.2	Imagerie des tumeurs <i>ex vivo</i>	219
13.3.3	Comparaison des différentes modalités d'imagerie	225
13.4	Conclusion	226
	Conclusion & perspectives	229
	Bibliographie	236

Introduction générale

Le cancer est une cause importante de mortalité dans le monde et représente, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 13% de la mortalité mondiale. Malgré les progrès médicaux considérables pour le traitement de cette maladie, certains types de cancers sont toujours synonymes d'un mauvais pronostic. Les tumeurs primitives du système nerveux central, qui représentent seulement 10 à 15 cas pour 100000 personnes et par an, en font partie. 65% de ces tumeurs sont des gliomes, qui évoluent en différents grades de malignité. Les gliomes de haut grade sont caractérisés par leur caractère invasif et diffus et conduisent à un pourcentage de survie des patients à 5 ans de 2%.

Le traitement standard actuel pour ces patients consiste en la résection chirurgicale de la masse tumorale principale, si sa localisation le permet, suivie d'une radiothérapie associée à une chimiothérapie adjuvante [Stup 09a]. Chaque modalité du traitement présente ses propres limites : du fait de la localisation intracérébrale, la chirurgie n'est parfois pas envisageable et quand bien même elle l'est, les cellules tumorales infiltrées dans les tissus sains ne sont pas résecables par cette méthode. L'injection de drogues chimiothérapeutiques se trouve limitée par la présence de la barrière hémato-encéphalique. Bien que cette barrière soit partiellement rompue au niveau des vaisseaux tumoraux, elle limite la diffusion des drogues dans la tumeur. L'efficacité de la radiothérapie est quant à elle fortement limitée par la tolérance des tissus sains. Le traitement classique pour les gliomes utilise des rayonnements de photons polychromatiques, de haute énergie (6 à 25 MV) et délivre 60 Gy en fractions journalières de 2 Gy . Ce traitement permet de contrôler la croissance tumorale, mais cet effet est généralement temporaire et ne permet pas la guérison complète des patients. Les enjeux thérapeutiques pour le traitement de cette maladie sont donc bien réels et occupent de nombreuses équipes de recherche en médecine, biologie, mais également en physique, afin d'améliorer le pronostic des patients atteints de tumeurs cérébrales.

En radiothérapie, le challenge consiste à créer un différentiel de dose entre le volume tumoral et les tissus sains. Ce différentiel peut être créé par différents moyens : fractionnement spatial, utilisation d'un faisceau d'ions (dont le dépôt d'énergie est maximal en fin de parcours), *etc.* Une autre méthode consiste à charger la tumeur en atomes de numéros atomiques élevés ($Z > 50$) et à la traiter par radiothérapie en utilisant un faisceau de photons de basse énergie (50-100 keV). Cette méthode a initialement été proposée dans les années 80, suite à la découverte de l'augmentation des dommages radio-induits dans les lymphocytes de patients ayant effectué une angiocardioraphie. L'iode, de numéro atomique supérieur à celui des tissus ($Z_I = 53$), rend les vaisseaux visibles aux rayons X lorsqu'il est injecté dans la circulation sanguine. Callisen et ses collaborateurs ont mesuré la survie des lymphocytes à la suite d'un tel examen et ont montré qu'elle était diminuée d'un facteur qui dépend de la concentration en iode et de l'énergie utilisée [Call 79]. Après cette découverte,

l'explication dosimétrique du phénomène a rapidement été mise en avant. *Mello* a calculé que la dose déposée dans une tumeur cérébrale profonde contenant 10 mg/mL d'iode pouvait être augmentée d'un facteur 2 par rapport à la dose déposée dans les tissus sains environnants, lorsqu'elle était irradiée à l'aide d'un faisceau de rayons X de 60 keV [Sant 83]. En effet, dans cette gamme d'énergies, les interactions X /matière dépendent fortement du numéro atomique des éléments et les sections efficaces des photons sont 1 à 2 ordres de grandeurs plus importantes avec les atomes lourds qu'avec les atomes légers. L'interaction majoritaire est l'effet photoélectrique pour lequel, le photon incident transfère localement toute son énergie au milieu. Plusieurs paramètres permettent d'ajuster l'augmentation de dose : le choix de l'élément lourd, sa concentration dans la tumeur, l'énergie des photons incidents et le choix des incidences d'irradiation.

L'équipe *Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale* de l'Institut de Neurosciences de Grenoble, en collaboration avec l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*), s'intéresse depuis plus de dix ans à ce traitement innovant pour la thérapie des tumeurs cérébrales. Le rayonnement produit sur la ligne médicale du synchrotron européen semble particulièrement adapté pour la méthode. En effet, il permet de générer des RX monochromatiques dans la gamme énergétique de la radiologie (20-100 keV), mais dont le flux reste adapté à la radiothérapie (de l'ordre du Gy/min). Son caractère monochromatique permet de limiter la dose à l'os (tissu particulièrement absorbant aux RX) et d'optimiser le dépôt de dose entre l'élément lourd choisi et les tissus sains. D'autre part, la sélection de l'énergie s'avère pertinente pour la compréhension des mécanismes radiobiologiques engendrés par une telle irradiation.

Les premiers travaux de l'équipe ont permis d'évaluer la combinaison RX /atomes lourds *in vivo*, chez le rongeur porteur d'un gliome F98. Une injection intraveineuse d'iode sous forme d'agent de contraste (1.5 mL à 350 mg/mL) a été associée à un traitement de radiothérapie délivrant une fraction unique de 15 Gy à l'aide d'un rayonnement de photons de 50 keV . Ce traitement a conduit à une augmentation de 44% de la survie des animaux, contre 20% chez les animaux recevant uniquement la radiothérapie [Adam 03]. Ce bénéfice thérapeutique peut être augmenté par une injection intracarotidienne de l'agent de contraste qui permet de concentrer plus fortement l'iode dans la tumeur : 4.2 ± 1.2 mg/mL contre 1.2 ± 1.0 mg/mL pour une injection intraveineuse [Adam 06]. Malgré l'augmentation de survie observée sur le modèle animal du laboratoire, aucune guérison complète n'a pu être obtenue avec ce protocole. En effet, l'utilisation d'atomes lourds sous forme d'agent de contraste présente des avantages certains :

- L'agent de contraste est utilisable à très forte concentration. L'Ioméron® (AC iodé) est par exemple commercialisé sous forme d'une solution injectable dont la teneur en iode vaut 350 mg/mL . Malgré le facteur de dilution important, une injection d'une telle solution dans la circulation sanguine permet de d'accumuler l'élément lourd à une concentration de l'ordre du mg/mL dans la tumeur cérébrale.
- L'agent de contraste est par définition non toxique *in vivo* et déjà validé pour une application clinique.

Mais ces avantages sont à modérer par des limites évidentes. Bien que l'agent de contraste puisse être injecté à forte concentration, la présence de la barrière hémato-encéphalique qui n'est que partiellement rompue au niveau de la tumeur, limite la quantité d'atomes lourds qui peut s'accumuler à l'intérieur de celle-ci. Cette limite conduit à une efficacité biologique de l'irradiation qui est insuffisante pour éliminer complètement la tumeur.

Ce protocole fait aujourd'hui l'objet d'essais cliniques de phases I et II, qui ont débuté chez l'homme en juin 2012, sur la ligne médicale de l'ESRF. Ces essais cliniques ont pour premier objectif de démontrer la faisabilité du traitement au synchrotron. Ils s'inscrivent dans la continuité d'un traitement conventionnel délivré par le CHU de Grenoble et ne considèrent pour l'instant, que des métastases au diamètre inférieur à 3 *cm*. Ce travail se fait en parallèle d'une recherche pré-clinique intense afin de trouver des solutions pertinentes pour augmenter l'efficacité biologique de la combinaison *RX*/atomes lourds. Et c'est dans ce contexte de recherche que s'inscrit mon travail de thèse qui a pour principal objectif l'évaluation du potentiel thérapeutique des nanoparticules métalliques pour la radiothérapie synchrotron.

Les nanoparticules composées d'atomes de numéros atomiques élevés (Or, Platine essentiellement) font l'objet depuis quelques années, d'un intérêt grandissant pour la radiosensibilisation tumorale. Les travaux pionniers dans le domaine ont certainement été réalisés par *Hainfeld et al.* qui ont montré dès 2004 une guérison importante (86% de survie à long terme) de souris porteuses de tumeurs sous-cutanées grâce à la combinaison d'une injection intraveineuse de 2.7 *g/kg* de nanoparticules d'or (AuNPs, 1.9 *nm* de diamètre) suivie d'une radiothérapie *X* délivrant une fraction de 26 *Gy* à 250 *kVp*. Cet effet s'est montré dépendant de la concentration de nanoparticules injectées puisqu'une injection de 1.35 *g/kg* a conduit à seulement 50% de survie à long terme et la radiothérapie seule n'a guéri que 20% des animaux [Hain 04]. Depuis la publication de ces résultats très positifs, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à ce phénomène dans le but d'exploiter mais également d'expliquer les effets, qui ne semblent pas tout à fait identiques à ceux observés pour la combinaison *RX*/atomes lourds sous forme d'agent de contraste. La diversité des méthodes et des modèles expérimentaux ne simplifie pas la compréhension des mécanismes mis en jeu, mais plusieurs caractéristiques intéressantes des nanoparticules ressortent de ces études :

- Le regroupement des atomes lourds sous forme de billes aux dimensions nanométriques permet de concentrer localement les atomes de numéro atomique élevé et de modifier ainsi le dépôt de dose d'une manière importante à l'échelle nanométrique.
- Les nanoparticules peuvent être très souvent internalisées par les cellules, ce qui permet de localiser les atomes lourds à proximité des cibles biologiques critiques (ADN et membranes cellulaires notamment).
- Les nanoparticules peuvent être fonctionnalisées par des molécules diverses créant une possibilité pour le ciblage de récepteurs ou compartiments cellulaires spécifiques.
- Les nanoparticules sont synthétisées pour être stables en milieu physiologique et avoir une durée de vie importante dans la circulation sanguine.
- Les petites nanoparticules (< 10 *nm*) sont rapidement éliminées par voies sanguine ou rénale *in vivo*.
- Malgré une amplitude et une dépendance à l'énergie des photons incidents variées, leur potentiel de radiosensibilisation a été observé *in vitro*, dans la majorité des études portant sur le sujet.

Tous ces avantages sont bien sûr à tempérer avec le fait que les effets à long terme des nanoparticules sur le vivant sont encore peu connus et que des études préliminaires ont montré des effets toxiques indésirables au moins à l'échelle de la cellule [Jena 12] [Magd 13]. D'autre part, le potentiel de radiosensibilisation observé n'est pas encore clairement compris et la variation de son amplitude entre les lignées cellulaires ou selon les types de NPs utilisées n'ont pas toujours d'explications

évidentes.

La problématique générale de cette thèse concerne l'étude du potentiel thérapeutique des nanoparticules dans le cadre d'une utilisation pour un traitement de radiothérapie synchrotron. Ce travail a été réalisé en grande partie sur la ligne médicale du synchrotron, au sein de l'équipe INSERM *Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale* de l'Institut des Neurosciences de Grenoble et du laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques du CEA de Grenoble. La compréhension des mécanismes responsables de l'augmentation de la radiotoxicité a été un des principaux objectifs de ce travail. Elle a été étudiée *in vitro* essentiellement, sur la lignée cellulaire F98 (cellules gliales chez le rongeur). Le second objectif de cette thèse a concerné l'optimisation de la distribution des nanoparticules dans la tumeur afin d'augmenter leur efficacité thérapeutique *in vivo*. Dans ce but, une méthode de tomographie X à deux énergies a été caractérisée, puis utilisée pour l'imagerie simultanée de la tumeur (mise en évidence par prise de contraste iodé) et la distribution des nanoparticules injectées directement au sein de la tumeur cérébrale chez le rongeur.

Le manuscrit s'organise autour de quatre parties principales. La première introduit les spécificités liées aux tumeurs cérébrales ainsi que les limites des traitements actuellement disponibles. Les conséquences biologiques d'une irradiation de photons seront décrites. La ligne médicale de l'ESRF et ses outils pour l'imagerie et la thérapie des gliomes seront également détaillés avant de faire un bref état de l'art sur les capacités de radiosensibilisation des nanoparticules. L'ensemble de ces informations permettront de comprendre et de justifier l'intérêt porté aux nanoparticules pour la radiothérapie synchrotron.

Trois types de nanoparticules différents ont ensuite été utilisés au cours de ce travail. La seconde partie du manuscrit décrit le comportement de cellules gliales exposées à ces nanoparticules. La toxicité, évaluée en termes de survie cellulaire, mais également de perturbation du cycle et de la prolifération cellulaire, ainsi que la distribution subcellulaire des nanoparticules seront les deux paramètres étudiés.

L'association d'une telle exposition de nanoparticules à un rayonnement de photons sera décrite dans une troisième partie. Les études y ont été conduites avec le souci de comprendre la nature de l'effet radiotoxique, d'évaluer son importance par rapport à celui provoqué par un agent de contraste et d'évaluer l'influence de la distribution subcellulaire des nanoparticules au moment de l'irradiation. Le rayonnement synchrotron, monochromatique et dont l'énergie peut être choisie entre 20 et 100 *keV* sur la ligne médicale de l'ESRF, a été un grand atout pour réaliser ces études. L'efficacité des nanoparticules a également été testée *in vivo* sur un modèle de tumeur cérébrale chez le rongeur.

Finalement, dans le but d'optimiser le recouvrement de la tumeur par des nanoparticules injectées par voie directe dans le cerveau, une méthode de tomographie à deux énergies développée au synchrotron, a été caractérisée puis utilisée dans le cadre de cette thèse. La méthode sera décrite dans la dernière partie du document et les résultats relatifs à l'imagerie simultanée de deux éléments lourds dans le cerveau d'un rongeur seront présentés. Une conclusion générale résumera finalement les principaux résultats de ce travail et en évoquera les perspectives les plus directes.

Première partie

État de l'art & problématique

Chapitre 1

Gliomes et options thérapeutiques

Sommaire

1.1	Épidémiologie et classification des tumeurs cérébrales gliales	8
1.1.1	Épidémiologie des tumeurs cérébrales	8
1.1.2	Classification des gliomes	8
1.2	Le cerveau, environnement des tumeurs cérébrales	10
1.2.1	Architecture du système nerveux	10
1.2.2	Vascularisation cérébrale	10
1.2.3	Angiogénèse et néoangiogénèse	12
1.2.4	Rupture de la barrière hémato-encéphalique	12
1.2.5	Effet EPR (<i>Enhanced Permeability and Retention</i>)	13
1.2.6	<i>Convection-Enhanced Delivery</i>	13
1.3	Les options thérapeutiques et leurs limites	15
1.3.1	Options thérapeutiques	15
1.3.2	Traitement conventionnel	16
1.3.3	Optimiser la radiothérapie externe	17

L'équipe RSRM (Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale) du GIN, dans laquelle ce travail a eu lieu, s'intéresse depuis plusieurs années au traitement des gliomes de haut grade. Ces tumeurs cérébrales ne sont actuellement pas guéries et laissent aux patients une espérance de vie d'environ 15 mois après diagnostic. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte médical et le premier chapitre vise à présenter la maladie (incidence, caractéristiques) et les limites des traitements actuellement disponibles.

1.1 Épidémiologie et classification des tumeurs cérébrales gliales

1.1.1 Épidémiologie des tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales sont peu fréquentes au regard de nombreux autres types de cancers comme celui de la prostate, du sein ou des poumons. Cependant, elles constituent une source de mortalité et d'invalidité importante [Coun 98]. D'après le Central Brain Tumor Registry des États-Unis, l'incidence annuelle des tumeurs primaires du Système Nerveux Central (SNC), est de 14.1 pour 100000 personnes. Le Scottish Cancer Registry a également montré que ces tumeurs constituaient le 5^{ème} type de cancer le plus mortel chez les moins de 65 ans.

Dans le cadre du Plan Cancer 2009-2013, l'Institut National contre le Cancer (INCa) et ses partenaires ont présenté les données recensées par le centre d'épidémiologie sur les causes médicales des décès entre 2003 et 2007 en France. Elles font état de 1650 décès annuels chez les hommes et 1300 chez les femmes dus aux tumeurs du système nerveux central. L'âge médian du décès étant de 63 et 67 ans chez ces deux catégories de personnes respectivement.

Des caractéristiques épidémiologiques plus précises ont été mises en évidence par Counsell et ses collaborateurs en 1998. Les résultats de 20 études cliniques indépendantes ont permis de montrer différents points : l'incidence de tumeurs neuroépithéliales et méningiales augmente sévèrement avec l'âge des individus. Les tumeurs neuroépithéliales sont 40% plus fréquentes chez les hommes que chez les femmes contrairement aux méningiomes et aux tumeurs des nerfs crâniens qui sont respectivement 80 et 40% plus fréquentes chez les femmes. Les études montrent une augmentation de l'incidence globale à partir des années 1980 mais plusieurs éléments laissent à penser que cette observation serait due à l'amélioration des techniques diagnostiques et l'apparition du scanner notamment. Finalement, aucun lien n'a pu être établi entre l'incidence des tumeurs cérébrales et les conditions environnementales [Coun 98].

Plus de 36% des tumeurs cérébrales primaires sont des gliomes malins, ce qui les place au rang des tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte [Rain 11]. D'un point de vue général, les gliomes représentent 20% des tumeurs chez l'enfant et 2% chez l'adulte. Les gliomes malins se développent principalement dans la matière blanche ou dans la matière grise profonde du cerveau. Ils sont caractérisés par l'importante capacité de migration des cellules les composant, leur croissance diffuse et rapide et la grande variété des altérations génétiques accumulées. Ces caractéristiques particulières ainsi que leur localisation, les rendent très résistants à l'ensemble des thérapies disponibles.

1.1.2 Classification des gliomes

La classification des tumeurs cérébrales a été initiée en 1956 par la World Health Organization (WHO), dans le but de mieux adapter les traitements. La première édition, publiée par Zülch en 1980, se base principalement sur des critères histologiques. On distingue les astrocytomes, dérivant des cellules astrocytaires, les oligodendrogliomes, provenant des cellules oligodendrocytaires et les oligoastrocytomes (tumeurs mixtes). Les astrocytomes sont les gliomes les plus fréquents [Zulc 80]. Cette classification s'est peu à peu enrichie avec l'apparition de critères immunohistochimiques dès la deuxième édition et la détermination du profil génétique des tumeurs, dans la troisième édition (publiée en 2000).

En plus d'une classification, le diagnostic pathologique des tumeurs cérébrales gliales comprend un grade, qui évalue la malignité de la lésion (de I à IV, IV étant le grade le plus malin). Les gliomes sont différenciés en fonction de leur caractère diffus. Les gliomes bien délimités peuvent être soignés par résection chirurgicale (en fonction de leur localisation) et sont associés aux bas grades (I et II). Ils sont souvent bénins [Hoff 80]. *A contrario*, les gliomes diffus ou infiltrant (grades III et IV) sont difficilement résecables par chirurgie. Ils sont communément appelés gliomes malins ou de haut grade. Ce sont les plus agressifs et les plus courants parmi les tumeurs primaires du cerveau. La survie moyenne de ces patients est d'environ 15 mois après diagnostic.

L'apparition d'un cancer est synonyme d'instabilités génomiques que l'on différencie en instabilités chromosomiques et instabilités des microsatellites [Hana 11]. La mesure de ces instabilités a pour but de former des sous-groupes tumoraux qui permettraient d'établir des stratégies de traitement plus adaptées. Ce travail est aujourd'hui en plein essor grâce aux nouvelles techniques de micro puce et de séquençage du génome, mais il s'avère fastidieux car les profils tumoraux apparaissent de plus en plus complexes à mesure que les outils pour les mesurer se développent [Blee 12]. Dès 2001, *Watson et al.* montrent que la détermination du profil génétique des tumeurs cérébrales permet une sous classification sur des critères hématologiques ou de malignité [Wats 01]. En 2005, *Hoang* et ses collaborateurs montrent que des profils génétiques peuvent être établis et corrélés aux données histologiques et cliniques de sous groupes tumoraux [Hoan 04]. Ils découvrent que les tumeurs astrocytaires empruntent des voies de progression tumorale alternatives. Les glioblastomes secondaires sont associés à une mutation de TP53 (gène Tumor Protein p53¹). Cette mutation entraîne une prolifération incontrôlée des cellules tumorales. Les glioblastomes *de novo* sont quant à eux associés à une amplification de la protéine EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor²). D'autre part, les tumeurs oligodendrocytaires sont associées à des pertes fréquentes des bras 1 et 19 sur les chromosomes p et q respectivement (peu fréquentes dans les astrocytomes, moins de 10%). Ces altérations sont des marqueurs de pronostic favorable et des indicateurs de chimio-sensibilité [Cair 98].

De manière plus générale, trois principales fonctions sont altérées dans le cas des gliomes : la régulation de la signalisation cellulaire impliquée dans la survie et la prolifération, la régulation du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose [Blee 12]. Les tumeurs des patients à faible espérance de vie présentent plus d'altérations génétiques que celles des patients aux survies prolongées [Burt 02]. La classification moléculaire des gliomes n'est pour le moment pas utilisée en clinique. Des tests *in vitro* sont encore nécessaires pour comprendre les relations entre profil génétique et efficacité thérapeutique [Blee 12].

1. Le gène TP53 est responsable de la production de la protéine p53 qui agit comme suppresseur de tumeur en régulant la division cellulaire. Elle préserve les cellules d'une division trop rapide ou incontrôlée. La protéine p53 se situe dans le noyau des cellules. Lorsque l'ADN est endommagé, la protéine joue un rôle crucial dans le devenir de la cellule. Si les dommages sont réparables, la protéine active d'autres gènes qui permettront la réparation. Si les dommages ne sont pas réparables, la protéine empêche la division cellulaire et signale la mort cellulaire par apoptose.

2. La protéine EGFR se situe sur les membranes cellulaires. Sa liaison à un ligand conduit à la prolifération cellulaire.

1.2 Le cerveau, environnement des tumeurs cérébrales

1.2.1 Architecture du système nerveux

Le système nerveux se compose de deux parties distinctes : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le premier comprend l'encéphale (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et la moelle épinière. Son principal rôle consiste à recevoir et à interpréter les signaux qui proviennent de la périphérie du SNC et à organiser la réponse à envoyer au SNP. Le second comprend les nerfs crâniens et les nerfs spinaux rattachés au SNC. Son rôle est de conduire jusqu'au SNC les informations issues des récepteurs périphériques de la sensibilité ou de la douleur et de transmettre les ordres moteurs émis par les centres nerveux. A quelque niveau que ce soit, le SNC est composé de deux parties différentes caractérisées par leur teinte : la substance grise et la substance blanche. La substance grise est formée des corps cellulaires des neurones, de leurs dendrites, des arborisations terminales d'axones et des cellules gliales. La substance blanche est constituée d'axones. Le neurone est une cellule spécialisée qui n'existe pas de manière isolée mais fait partie d'un réseau ordonné et hiérarchisé. La transmission nerveuse se fait par l'intermédiaire de plusieurs neurones en rapport les uns avec les autres par leurs dendrites ou par l'articulation d'un axone avec les dendrites d'une ou plusieurs cellules voisines. La jonction entre deux neurones constitue une synapse. Le neurone est composé d'un corps cellulaire, des dendrites (prolongements courts, ramifiés et nombreux pour offrir une grande surface de contact entre les cellules nerveuses), d'un axone (prolongement le plus long, terminé par de nombreuses ramifications), de synapses et d'un cytosquelette. Les cellules gliales forment quant à elles, l'environnement des neurones. Elles assurent le maintien de l'homéostasie³, produisent la myéline⁴ et jouent un rôle de soutien et de protection du tissu nerveux en leur apportant nutriments et oxygène, en éliminant les cellules mortes et en combattant les pathogènes (cf. Fig. 1.1). Les cellules gliales représentent environ 90% des cellules cérébrales. On distingue en général quatre principaux types de cellules gliales :

- Les astrocytes
- Les oligodendrocytes dans le SNC et les cellules de Schwann dans le SNP
- La microglie
- Les cellules épendymaires

Contrairement à la grande majorité des neurones, les cellules gliales peuvent se diviser par mitose. Pendant longtemps, l'implication des cellules gliales dans le traitement de l'information nerveuse a été ignorée par rapport au rôle prédominant des neurones, mais il est aujourd'hui reconnu qu'elles exercent une action modulatrice sur la neurotransmission bien que le détail de ces mécanismes reste mal compris [Alle 09].

1.2.2 Vascularisation cérébrale

Le cerveau est l'organe le plus irrigué du corps humain. Il représente 2% de la masse corporelle totale mais consomme 20% des apports en dioxygène. Un système vasculaire efficace et capable d'alimenter le cerveau en dioxygène et en nutriments est donc nécessaire. Le figure 1.2 illustre cette

3. Homéostasie : capacité que peut avoir un système quelconque à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures.

4. Myéline : substance constituée principalement de lipides dont les couches alternent avec des couches de protéides. De façon générale, la myéline sert à isoler et à protéger les fibres nerveuses, comme le fait le plastique autour des fils électriques.

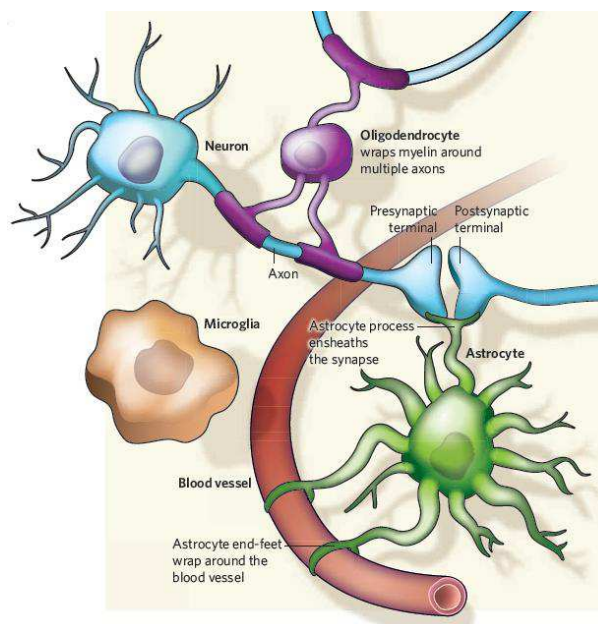


FIGURE 1.1 – Schématisation de l'interaction des différentes cellules gliales avec les neurones et les vaisseaux sanguins cérébraux. Figure extraite de [Alle 09].

importante vascularisation, mise en évidence par une préparation au Baryum dans le cerveau d'un rongeur. Il existe cinq niveaux de vaisseaux cérébraux : les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines. La surface totale d'échanges entre les vaisseaux et les cellules cérébrales est estimée à 10 mm^2 par mm^3 de tissu. Cela correspond à une distance maximale de $10 \mu\text{m}$ entre une cellule cérébrale et un capillaire. Les mesures de perfusion cérébrale décrivent la circulation sanguine à toutes les échelles de la vascularisation.



FIGURE 1.2 – Image en absorption d'un cerveau de rat dans lequel on a injecté du baryum (600 mg/mL), obtenue au synchrotron de Grenoble avec des rayons X de 20 keV et une taille de voxel de $1.4 \mu\text{m}$. Figure extraite de [Plou 04].

D'un point de vue fonctionnel, deux types d'autorégulation permettent aux vaisseaux de modifier leur diamètre pour répondre de façon adaptée à des changements physiologiques. Lorsque la pression artérielle systémique augmente, les artéioles cérébrales effectuent une vasoconstriction ; réciproquement on observe une vasodilatation lorsque la pression artérielle systémique diminue. Ces réponses permettent le maintien d'un flux sanguin cérébral optimal.

D'un point de vue anatomique, les vaisseaux cérébraux établissent entre eux des connexions appelées anastomoses qui leur permettent de compenser d'éventuelles insuffisances. Ces caractéristiques anatomiques et fonctionnelles permettent d'ajuster rapidement les flux sanguins régionaux afin de répondre à la demande lors de changements du métabolisme du glucose ou du dioxygène qui font partie de l'activité normale du cerveau. Elles contribuent aussi à protéger le cerveau en situation pathologique (hypoxie, ischémie ou lésion tissulaire).

Les tumeurs cérébrales modifient de façon importante les paramètres hémodynamiques du cerveau. Deux phénomènes sont en cause :

- La néoangiogénèse
- La rupture de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)

1.2.3 Angiogénèse et néoangiogénèse

L'angiogénèse décrit le développement du réseau vasculaire. La néoangiogénèse correspond au développement anarchique de la vascularisation locale, à partir de vaisseaux primitifs, permettant un apport nutritif et en dioxygène important. La néoangiogénèse varie selon les tumeurs. De manière générale, une croissance rapide de celles-ci nécessite une surproduction de capillaires sanguins pour répondre aux besoins nutritionnels du tissu. Lorsque la vascularisation ne se développe pas assez rapidement, il y a apparition de régions nécrosées où les cellules sont en situation d'hypoxie (souvent au centre de la tumeur). Du fait de leur croissance rapide, les capillaires tumoraux sont souvent perméables et hémorragiques. Le facteur de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) joue un rôle important dans ce développement anarchique et est souvent sur-exprimé dans les gliomes. La taille des capillaires est également plus importante d'un facteur 4 ou 5 dans le cas des tumeurs que dans les tissus sains [Beau 09].

1.2.4 Rupture de la barrière hémato-encéphalique

La signalisation neuronale requiert un micro-environnement très sain. La Barrière Hémato Encéphalique (BHE), système dynamique en équilibre, en assure la protection. Elle se compose de cellules endothéliales aux jonctions serrées, qui sont en contact avec les autres cellules du système nerveux décrites précédemment [Abbo 10]. Ces cellules forment une barrière physique entre la circulation sanguine et les tissus cérébraux. Le maintien de l'intégrité de la BHE est absolument nécessaire sous peine de conséquences chimiques et physiologiques importantes au niveau du système nerveux.

Plusieurs pathologies, comme par exemple l'hypertension, l'ischémie, certaines infections ou les tumeurs, peuvent néanmoins induire des lésions de la BHE. La figure 1.3 représente la BHE au niveau de tissus sains et de tissus tumoraux.

Du fait de la croissance accélérée des nouveaux vaisseaux dans les tumeurs, les jonctions entre

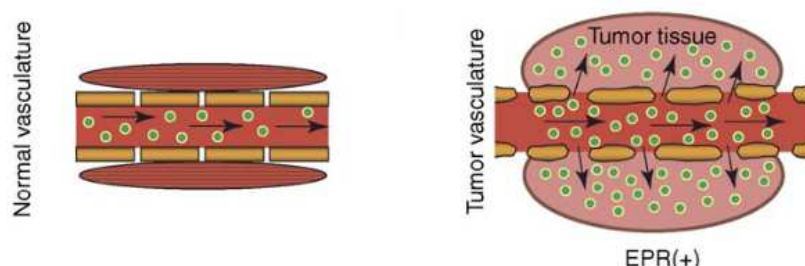


FIGURE 1.3 – Représentation d’un vaisseau sanguin et de la BHE au niveau de tissus sains et de tissus tumoraux. La BHE lésée permet aux constituants du sang et aux molécules qu’il transporte de s’extravaser dans l’espace interstitiel [Iyer 06].

les cellules endothéliales ne sont pas aussi serrées qu’au niveau des vaisseaux sanguins sains. Les capillaires laissent alors passer les constituants du sang et ce qu’ils transportent dans l’espace interstitiel du tissu. Ce phénomène est appelé extravasation et son étude permet de caractériser le stade de développement tumoral. Le degré de lésion de la BHE peut être très hétérogène dans une même tumeur.

1.2.5 Effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*)

La rupture de la BHE peut être utilisée pour cibler la région tumorale de manière passive. Ce ciblage a un intérêt en imagerie comme en thérapie puisque de nombreuses techniques impliquent la délivrance d’agents de contraste ou de chimiothérapie, spécifiquement au niveau de la tumeur. Une injection intraveineuse de ces agents permet alors de diffuser le produit jusqu’au cerveau, préférentiellement dans les zones où la BHE est lésée.

Les molécules de fort poids moléculaire (macromolécules, nanoparticules, particules lipidiques) se concentrent de manière plus importante dans la tumeur que les molécules de faible poids moléculaire [Iyer 06]. En effet, ces dernières circulent facilement à travers les pores des vaisseaux sanguins et sont rapidement éliminées par la circulation sanguine. À l’inverse, les macromolécules sont piégées dans les tissus lésés, où le drainage lymphatique est faible et le retour veineux est lent (cf. Fig 1.4). Ce phénomène permet d’accumuler de 10 à 50 fois plus de drogues au niveau de la tumeur que dans les tissus sains et est couramment désigné par le terme d’effet EPR, pour *Enhanced Permeability and Retention effect*.

1.2.6 *Convection-Enhanced Delivery*

Dans certains cas, l’effet EPR ne permet pas d’accumuler une quantité suffisante de drogues au niveau de la tumeur. L’injection du composé, par voie directe dans le milieu interstitiel du tissu peut être envisagée pour augmenter la concentration locale du produit. La méthode de CED (*Convection-Enhanced Delivery*) est une méthode d’injection directe, introduite par Bobo *et al.* en 1994. Elle consiste à injecter une solution avec un faible débit, pour permettre la distribution

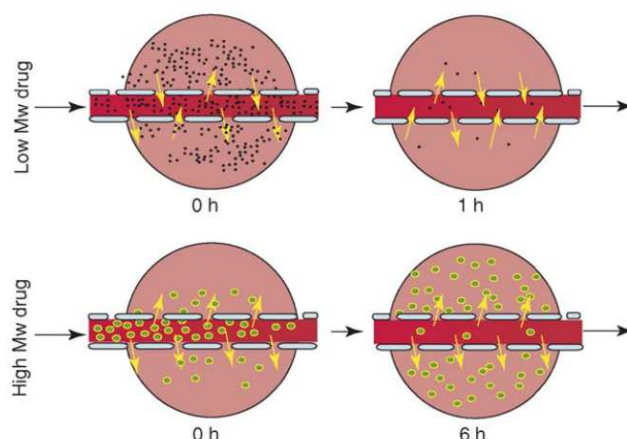


FIGURE 1.4 – Extravasation de molécules de faible poids moléculaires et de fort poids moléculaires dans l'espace interstitiel de tissus tumoraux. Les petites molécules sont rapidement éliminées par la circulation sanguine tandis que les macromolécules s'accumulent dans les tissus [Iyer 06].

de fortes concentrations de drogues par convection, dans le milieu interstitiel. Cette technique permet de réduire la toxicité systémique de certaines drogues [Bobo 94], d'augmenter le volume de distribution par rapport à une simple diffusion (5 à 10 fois plus important) et d'éviter les gradients de concentrations trop élevés [Morr 94]. Elle s'avère également intéressante dans le cas du cerveau où elle permet de s'affranchir de la BHE qui n'est que partiellement rompue au niveau des tissus tumoraux et constitue un obstacle à la pénétration des drogues. La figure 1.5 représente la différence de distribution d'une solution injectée par simple diffusion ou par convection.

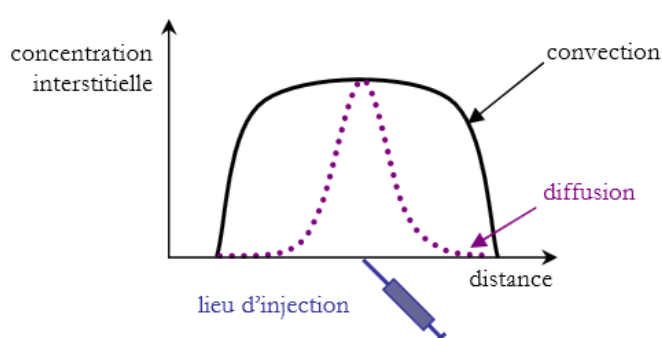


FIGURE 1.5 – Profils des concentrations obtenus en administrant une drogue par convection ou diffusion. La convection permet d'obtenir une concentration élevée dans un large volume tandis que la diffusion est associée à une décroissance exponentielle de la concentration depuis le point d'injection [Rous 07a].

A l'inverse de la diffusion qui décrit une migration d'espèces chimiques dans un milieu, la

convection consiste au transport d'une solution par transfert de matière. Ce phénomène résulte d'un gradient de pression dans le milieu [Rous 07a]. La distribution d'une solution dans un tissu biologique dépend du débit d'injection, du diamètre de l'aiguille, de la concentration du composé, du volume injecté et de la nature de l'agent injecté.

1.3 Les options thérapeutiques et leurs limites

1.3.1 Options thérapeutiques

Il existe trois principales options thérapeutiques pour le traitement des gliomes : La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Chacune possède ses avantages et ses limites mais les thérapeutes cherchent à les associer pour augmenter leur efficacité.

La chirurgie n'est pas toujours possible et dépend de la localisation de la tumeur dans le cerveau. Lorsqu'elle est possible, elle peut s'avérer efficace si elle est précoce. L'excision d'un gliome de bas grade permet souvent d'éviter l'évolution de la lésion vers une forme cancéreuse, car il est plus facile de retirer la totalité des cellules tumorales lorsqu'elles sont encore peu infiltrées. Du fait de sa localisation dans le cerveau, la résection d'un gliome peut engendrer des séquelles. Une dizaine de centres en France pratiquent aujourd'hui la chirurgie éveillée. Le patient est réveillé pendant l'opération et le chirurgien vérifie ses capacités fonctionnelles à mesure de la résection. Cette technique récente présente deux principaux avantages : la diminution des séquelles post-opératoires et l'élargissement de la zone retirée.

La chimiothérapie est quasiment toujours utilisée pour le traitement des tumeurs cérébrales. L'agent chimiothérapeutique standard pour les gliomes malins de grades III et IV est le temozolomide⁵, introduit au début des années 2000 après les études de *Stupp et al.* (cf. section 1.3.2, p. 16). Cependant, beaucoup de gliomes sont peu sensibles à une chimiothérapie et cela pour différentes raisons :

1. La BHE constitue un obstacle au passage des molécules. Bien qu'elle soit partiellement lésée au niveau de la tumeur, elle limite le choix des agents chimiothérapeutiques. Des études sont réalisées pour accroître la perméabilité de cette barrière. Par exemple, *Matsukado* et ses collaborateurs ont montré qu'un analogue de la Bradykinine vasoactif RMP-7 augmente l'accumulation de carboplatine chez le rat porteur d'un gliome RG2. Cela entraîne également une augmentation de la survie [Mats 96]. Cependant, il faut rester prudent car ces agents peuvent avoir d'autres conséquences pas toujours bien connues. Les expériences ont montré que la Bradykinine augmentait fortement la migration/invasion des cellules d'un gliome *via* les capillaires sanguins [Mont 11].

2. Les corticoïdes (fréquemment utilisés en neuro-oncologie pour limiter les œdèmes cérébraux) diminuent la perméabilité de la BHE. Ils sont également sécrétés chez les êtres humains et ont des propriétés anti-inflammatoires. Ils permettent une réduction de l'hypertension intracrânienne et une amélioration fonctionnelle rapide.

3. Les anti-épileptiques Enzyme-induisant (EI-AED, Enzyme-induisant Anti-epileptic Drugs) limitent l'efficacité des agents chimiothérapeutiques alkylants [Ober 05]. Ils interagissent avec une enzyme qui dégrade les molécules étrangères et en particulier les médicaments. La prise d'un anti-épileptique est cependant obligatoire avec un glioblastome, à titre préventif.

5. Le temozolomide est un agent chimiothérapeutique qui agit par alkylation de l'ADN.

4. Les enzymes de réparation : L'alkyltransférase MGMT est une protéine de réparation de certaines méthylations de l'ADN et principalement de l'O⁶-méthylguanine ainsi que de l'O⁴-méthylguanine. Les patients MGMT-/- (environ 30%) répondent donc mal à un agent chimiothérapeutique alkylant (type temozolomide). Les patients MGMT+/- (environ 40%) ont une réponse variable [Hegi 04].

La radiothérapie repose sur un principe fondamental : déposer un maximum de dose dans la tumeur sans pour autant endommager les tissus sains environnants. La tolérance du tissu sain cérébral a été déterminée sur la base des effets secondaires induits par les rayonnements ionisants. Elle est communément fixée à 60 Gy (délivrés en 30 fractions de 2 Gy). Il existe une toxicité particulière des rayonnements ionisants sur le SNC. Les deux principales complications sont la radionécrose et la détérioration intellectuelle. La première est de moins en moins observée aujourd'hui, grâce au fractionnement temporel de la dose (cf section 1.3.3, p. 17). On la retrouve cependant pour les traitements à forte dose dans le cas de radiochirurgie essentiellement. Les détériorations intellectuelles sont plus étudiées chez l'enfant que chez l'adulte. Elles touchent principalement la mémoire et la gravité est variable.

En 1978, Walker et ses collaborateurs montrent pour la première fois une augmentation significative de la survie des patients ayant reçu une radiothérapie post-opératoire. La survie moyenne passe alors de 14 à 35 semaines [Walk 78]. Une irradiation de moins de 55 Gy donne de moins bons résultats tandis qu'une irradiation de plus de 60 Gy favorise l'apparition de lésions actiniques.

Aujourd'hui, différentes techniques sont mises en places pour améliorer la qualité de l'irradiation. Les développements en imagerie médicale permettent de mieux définir les volumes à irradier. La prise en compte de marges autour du volume tumoral a pour objectif de toucher les cellules infiltrées dans le tissu cérébral. Nous verrons à la section 1.3.3 (p. 17) les différentes techniques permettant d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

1.3.2 Traitement conventionnel

Le traitement actuellement proposé en clinique, aux patients porteurs d'un gliome malin, consiste dans un premier temps en une résection chirurgicale de la tumeur. Cette opération n'est pas toujours possible et dépend de sa localisation dans le cerveau. Elle est suivie par une combinaison de temozolomide et de radiothérapie. Cette thérapie a fait l'objet d'essais cliniques en 2003. Le temozolomide est une drogue cytostatique alkylante. A pH physiologique, elle est convertie en un composé de faible durée de vie : le Monomethyl Triazeno Imidazole Carboxamide (MTIC). Le MTIC agit par méthylation de l'ADN aux positions O6 et N7 de la Guanine, ce qui provoque l'inhibition de la réplication de l'ADN. Le temozolomide est administré par voie orale : 75 mg/m²/jour pendant la durée de la radiothérapie, suivi de six cycles de 5 jours, répétés tous les 28 jours (150 mg/m² pour le 1^{er} cycle et 200 mg/m² pour les suivants). La radiothérapie est délivrée par fractions de 2 Gy : 5 fractions/semaine pendant 6 semaines. La dose totale à la tumeur est 60 Gy. Une marge de 2/3 cm est considérée autour de la tumeur pour inclure les cellules infiltrantes. Un générateur de photons 6 MV est utilisé pour réaliser l'irradiation [Stup 05].

Les patients ont été suivis pendant cinq ans. Certains ont reçu la radiothérapie seule et d'autres, la radiothérapie associée au temozolomide (cf. Fig. 1.6). On observe une amélioration de la survie pour toutes les catégories de patients, quelque soit leur âge. La survie moyenne des patients à 2 ans est passée de 10.9% à 27.2%, pour la radiothérapie seule et combinée respectivement. Celle à 5 ans, de 1.9% à 9.8% des patients [Stup 09b]. La différence de survie entre les patients dépend de nombreux paramètres et peut être prévue en fonction de l'étendue de la résection chirurgicale, de l'âge et de

l'état de santé initial du patient [Gorl 08]. Malgré la faible augmentation de la médiane de survie (3 mois environ), les essais cliniques de *Stupp* représentent aujourd'hui les meilleurs résultats jamais obtenus pour le traitement des glioblastomes chez l'adulte. Des efforts de recherches sont encore nécessaires pour améliorer la survie des patients.

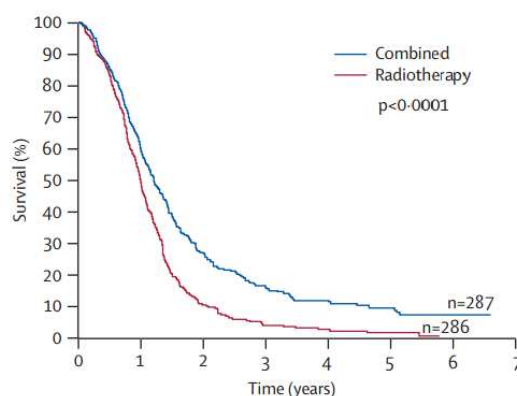


FIGURE 1.6 – Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des patients pour les différents groupes : radiothérapie seule (rouge), radiothérapie + témozolomide (bleu). Figure extraite de [Stup 09b].

1.3.3 Optimiser la radiothérapie externe

Les progrès techniques récents ont permis d'augmenter considérablement l'efficacité de la radiothérapie. Nous détaillerons dans cette section les différentes stratégies utilisées ou actuellement en développement. Les progrès en imagerie médicale (scanner et IRM essentiellement) ne seront pas développés ici, mais contribuent largement à l'amélioration de la définition des volumes cibles. Cette étape préliminaire au traitement est essentielle pour optimiser le plan d'irradiation spécifique à chaque patient.

Le fractionnement temporel consiste à diminuer la dose par fraction pour augmenter la dose totale à la tumeur sans pour autant accroître la toxicité. Ce principe a été découvert dès les débuts de la radiothérapie dans les années 1930 [Cout 32]. Très vite, on se rend compte que plusieurs fractions de faible dose (1.2 - 2Gy) répétées 30 à 70 fois, sont plus efficaces qu'une forte dose unique.

Pour des faibles doses (inférieures à 2 Gy), les capacités de réparation des cellules ne sont pas saturées. Si on délivre la dose de rayonnement en plusieurs fractions plutôt qu'une, les réparations après chaque fraction auront le temps d'être effectuées avant la fraction suivante (cf. Fig. 1.7). Le fractionnement temporel diminue les effets biologiques des radiations ionisantes. Il protège donc les tissus sains et tumoraux mais pas avec la même efficacité puisque les cellules tumorales ont moins de capacités de réparation que les cellules saines.

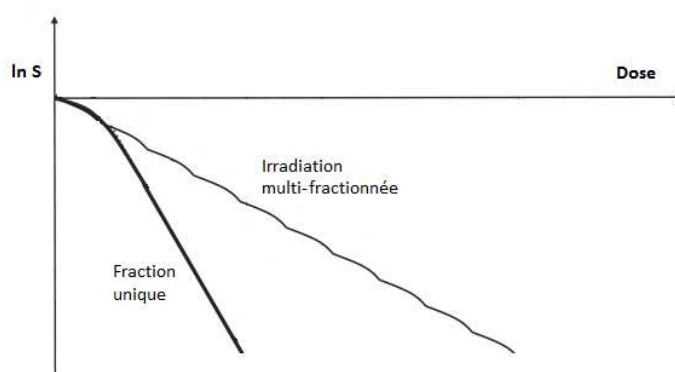


FIGURE 1.7 – Illustration des conséquences du fractionnement temporel de la dose sur la survie cellulaire.

Withers propose en 1975, la règle des quatre R pour expliquer le bénéfice du fractionnement temporel : Réparation, Réoxygénation, Redistribution et Repopulation [With 75].

1. La Réparation des lésions s'effectue grâce à des mécanismes enzymatiques, plus efficaces chez les cellules saines que les cellules tumorales. En effet, ces dernières sont souvent mutées et ont perdu leur capacité à activer les voies de réparation et d'arrêt du cycle cellulaire (cf. section 1.1.2, p. 8). Le fractionnement de la dose permet aux cellules saines de réparer leurs dommages sublétaux, au fur et à mesure du traitement.

2. La radiothérapie limite la compression des tissus et permet de réoxygéner les cellules malignes, les rendant plus sensibles à l'irradiation⁶.

3. La Redistribution repose sur le fait que les cellules sont plus sensibles aux rayonnements lorsqu'elles se trouvent en phase G2/M du cycle cellulaire. Elles sont à l'inverse plus radiorésistantes en phase S. Le fractionnement temporel permet le renouvellement des cellules dans chacune des phases entre deux fractions et l'homogénéisation du dépôt de dose dans les différentes phases de sensibilité des cellules.

4. Après une certaine dose, les cellules souches cancéreuses se divisent plus vite. On parle de Repopulation. Ce phénomène implique une augmentation de la dose en fin de traitement pour certains cancers. A ces quatre points, on ajoute parfois un cinquième : La Radiosensibilité intrinsèque à chaque type cellulaire. Ce facteur est à considérer au cas par cas. Aujourd'hui, un traitement classique de radiothérapie est toujours fractionné dans le temps. Pour certains cas particuliers, on choisira cependant de favoriser le fractionnement spatial qui permet d'utiliser des fractions de doses plus élevées.

Le fractionnement spatial est une technique plus récente. Elle apparaît avec le développement d'accélérateurs dédiés, le cyberknife, le Gamma knife, la tomothérapie, ou encore la radiothérapie microfaisceaux par rayonnement synchrotron. Le principe général consiste à multiplier les incidences et à croiser les faisceaux au niveau de la tumeur. La dose se cumule dans le volume cible et se répartie au niveau des tissus sains (cf. Fig. 1.8(a)).

6. Les cellules hypoxiques sont moins sensibles à la radiothérapie. Cette caractéristique importante constitue une thématique de recherche à part entière mais ne sera pas plus détaillée ici.

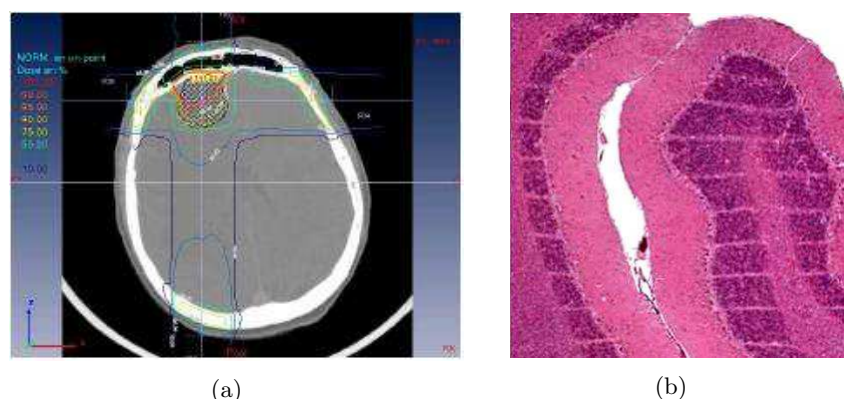


FIGURE 1.8 – (a) Illustration du fractionnement spatial pour une métastase du cerveau irradiée par quatre faisceaux orthogonaux. Figure extraite de la thèse de *Magali Edouard* [Edou 10]. (b) Effet de la radiothérapie microfaisceaux par rayonnement Synchrotron sur les tissus sains du SNC chez le petit cochon [Brau 10].

Le cyberknife est utilisé en clinique, pour le traitement de différentes tumeurs. Il s'agit d'un petit accélérateur linéaire producteur de rayons X , surmonté d'un bras robotisé qui permet de diriger le dépôt d'énergie dans n'importe quelle partie du corps et depuis n'importe quelle direction. Cette technique permet un ciblage très précis des volumes et donc une irradiation à plus fortes doses. En général, on applique une fraction unique qui peut être une sorte d'alternative à la chirurgie lorsque la tumeur est de petite taille et se situe dans un endroit difficilement opérable.

Le Gamma knife est un appareil dédié pour le traitement des tumeurs du cerveau. On positionne la tête du patient dans un support spécifique qui peut contenir jusqu'à 201 sources radioactives de Cobalt 60 (génération de rayons γ). Chaque source est collimatée pour ne cibler qu'un point dans le cerveau. Cette collimation fine permet d'utiliser de très fortes doses, en une seule fraction.

A l'inverse des deux techniques citées précédemment, la radiothérapie microfaisceaux par rayonnement synchrotron n'est pas encore utilisée chez l'homme. Comme son nom l'indique, la tumeur est irradiée par des faisceaux de rayons X , de dimensions micrométriques, très intenses et parallèles entre eux qui viennent s'entrelacer au niveau du volume cible. Le rayonnement synchrotron est suffisamment intense pour déposer des doses très élevées au niveau des faisceaux (plusieurs centaines de Gy) tout en respectant les limites de toxicité dans les tissus sains. Cependant, les mécanismes radiobiologiques ne sont pas encore complètement compris. La figure 1.8(b) représente une coupe histologique de tissu cérébral sain chez le petit cochon, après irradiation par microfaisceaux : $28 \mu m$ de large ; espacement inter-faisceaux de $210 \mu m$; dose dans les pics, $625 Gy$. Les tissus ont un aspect normal mis à part l'absence de noyaux dans les neurones et les cellules astrogliales sur le passage des microfaisceaux. Les auteurs s'intéressent à la réponse du tissu sain. Ils n'observent ni nécrose, ni hémorragie, ni dé-myélination [Brau 10]. D'autres études se penchent sur la réponse des tissus tumoraux et l'intérêt de la technique pour le traitement des glioblastomes. Des résultats encourageants ont été obtenus chez le rat porteur d'un gliome 9L, prolongeant la durée de vie moyenne de 63% par rapport aux animaux non traités [Regn 08].

Radiosensibilisation des cellules tumorales : La définition de la radiosensibilisation n'est pas toujours simple. Elle définit souvent les agents qui ont la capacité d'augmenter la sensibilité tumorale aux radiations, sans pour autant être toxiques eux-mêmes [Nias 85]. Nous verrons cepen-

dant que la frontière entre radiosensibilisant et agent chimiothérapeutique est parfois floue, comme l'illustre l'exemple du cisplatine, qui est considéré comme radiosensibilisant bien qu'il ait un effet thérapeutique seul.

La conséquence d'une irradiation sur une population de cellules peut se mesurer en terme de survie cellulaire. Cette survie dépend de la capacité des cellules à réparer les dommages radio-induits à l'ADN. C'est pour cela que l'ADN des cellules tumorales est souvent considéré comme la cible principale des radiations ionisantes. La diminution de la capacité de réparation des cellules tumorales permettrait donc d'augmenter leur radiosensibilité. Dans une synthèse du *Bulletin du Cancer*, *Deutsch et al.* résument les principales options de radiosensibilisation [Deut 05].

1. Certains agents cytotoxiques sont utilisés pour augmenter les dommages de l'ADN. Par exemple, le 5-fluoro-uracile inhibe la réparation tandis que le cisplatine majore les lésions. *Rousseau et al.* montrent qu'une injection intracérébrale de cisplatine en combinaison à une irradiation unique de 15 Gy (RX, 78.8 keV) augmente la moyenne de survie de rats porteurs d'un gliome F98 de 38 jours (Mean±SE = 37±2 jours *versus* 75±18 jours) [Rous 10].

2. Une seconde option consiste à cibler les mécanismes de radiorésistance en modulant les voies de signalisation qui peuvent être activées en réponse à une irradiation. Cette option découle de l'observation de l'augmentation de la radiorésistance des cellules qui possèdent une dérégulation des voies de signalisation. L'exemple le plus fréquemment rencontré est celui du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui est souvent surexprimé dans les tumeurs humaines et notamment les gliomes. Un blocage de ces récepteurs permet d'augmenter la radiosensibilité des cellules tumorales [Bonn 06].

3. La troisième option proposée consiste à agir sur le cycle cellulaire. La réponse des cellules à une irradiation passe souvent par une modification de leur distribution dans les différentes phases du cycle. Les cellules saines observent généralement un arrêt en phase G1/S. A l'inverse, les cellules tumorales au profil génétique moins stable n'observent pas cet arrêt et prolifèrent malgré les dommages radio-induits. Une thérapie génique qui restaure l'expression de la protéine sauvage p53 est envisagée par *El Deiry* et ses collaborateurs pour rétablir l'arrêt en G1 et l'apoptose post-irradiation [El D 93].

4. La dernière proposition concerne le ciblage de l'angiogénèse tumorale. *Folkman* montre qu'une tumeur *in vivo* ne peut pas se développer au delà de 3 mm sans modifier la vascularisation voisine. Cette limite de 3 mm correspond à la distance maximale de diffusion passive des nutriments [Folk 71]. Les agents anti-angiogéniques peuvent donc être considérés pour augmenter la radiosensibilité des tumeurs, et ce de manière plus générale que les agents anti-tumoraux puisque les cellules épithéliales sont génétiquement plus stables que les cellules tumorales. De nombreuses études sont actuellement en cours sur les agents anti-angiogéniques. On notera toutes fois que cette technique semble venir à l'encontre des données classiques sur le rôle de l'hypoxie comme facteur de radiorésistance. Malgré cela, certains résultats montrent un effet bénéfique des agents anti-angiogéniques en combinaison à une radiothérapie [Hann 00].

La hadronthérapie est une technique innovante de radiothérapie qui exploite les propriétés particulières d'interactions des hadrons dans la matière. Cette technique a commencé à être étudiée dans les années 50, mais se développe de manière très active encore aujourd'hui. Un hadron est composé de trois particules subatomiques : les quarks, les anti-quarks et les gluons. Le proton, noyau de l'atome d'hydrogène, se compose par exemple de deux quarks *up* et un quark *down*. L'hadronthérapie se pratique essentiellement avec les protons (H^+), de façon moins courante avec

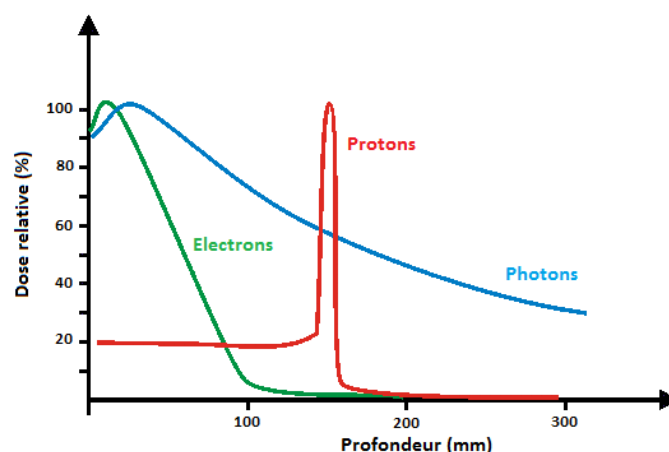


FIGURE 1.9 – Représentation schématique des rendements en profondeur d'un faisceau de photons, d'électrons et de protons dans de l'eau. Le pic de dose en profondeur caractéristique des faisceaux d'ions est appelé Pic de Bragg.

les ions carbonés (C^{6+}) et de manière encore moins fréquentes avec les neutrons rapides (n) et les noyaux d'Hélium (He^{2+} ou particules α). L'intérêt de ces particules réside dans le fait que leur dépôt d'énergie dans la matière n'est pas linéaire mais suit une forme particulière que l'on appelle communément Pic de Bragg (représenté sur la figure 1.9).

Le Pic de Bragg a été découvert par William Bragg en 1904 et illustre le fait que le dépôt d'énergie devient maximal en fin de parcours des particules. D'un point de vue pratique, les hadrons chargés sont accélérés via un accélérateur de particules, type cyclotron ou synchrotron. Ils possèdent alors une énergie cinétique (modulable) qui va déterminer la position du Pic de Bragg dans les tissus. L'addition de plusieurs irradiations successives à des énergies différentes permet de cibler une tumeur macroscopique par un fort dépôt de dose tout en respectant les doses de tolérance des tissus sains [Tobi 82]. Les avantages des hadrons par rapport aux photons sont nombreux :

1. Ils présentent une meilleure balistique. Le dépôt d'énergie est moins diffus et beaucoup plus concentré. Cela permet d'atteindre des tumeurs profondes, situées à proximité d'organes à risques.
2. Ils conduisent à un Effet Biologique Relatif (EBR)⁷ plus important. Les hadrons étant des particules lourdes et chargées, leur probabilité d'interactions est plus élevée que celle des photons. Cela conduit à une densité d'ionisations plus grande et à une augmentation de la complexité des dommages radio-induits.

L'hadronthérapie présente néanmoins quelques inconvénients :

1. Elle nécessite un contrôle parfait de l'irradiation. Si la cible n'est pas correctement atteinte il peut y avoir de graves conséquences sur la santé du patient. D'importants développements techniques vont actuellement dans ce sens (mise en place de contrôles en ligne pour la vérification en temps réel de l'irradiation).
2. La hadronthérapie représente un coût financier non négligeable qui peut freiner l'ouverture de nouveaux centres.

7. L'EBR sera défini plus en détail dans une prochaine section. On peut noter qu'à dose équivalente, les ions carbonés, plus lourds et plus chargés que les protons, ont une efficacité biologique plus grande que ces derniers.

Dans une revue récente, *Fokas* présente les différences radiobiologiques principales entre la hadronthérapie et la radiothérapie conventionnelle (photons)[[Foka 09](#)].

1. Les conséquences des dommages radio-induits dépendent de leurs distributions. Les rayonnements de haut Transfert d'Énergie Linéique (TEL) entraînent une forte densité d'ionisations qui est schématisée par la figure 1.10 pour les ions carbone et les protons respectivement. Cette forte densité d'ionisations est responsable de la complexité des dommages et par conséquent de l'augmentation de la mort cellulaire. Le dépôt d'énergie généré par des photons dans l'eau est de manière générale beaucoup moins dense, bien qu'il dépende de l'énergie des particules incidentes.

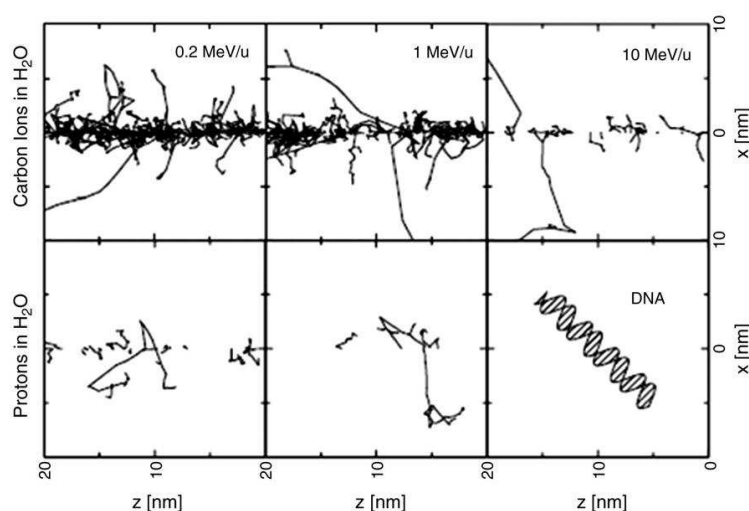


FIGURE 1.10 – Traces d'ions carbone et de protons dans de l'eau, avant, pendant et après le maximum de Bragg, comparés en terme de distance à la molécule d'ADN. Figure adaptée de [[Foka 09](#)].

2. La thérapie par ions lourds présente une seconde différence par rapport aux photons, qui concerne cette fois-ci la relation entre cycle cellulaire et radiosensibilité. Suite à une irradiation de haut TEL, les mécanismes de réparation sont majoritairement supprimés (dommages essentiellement létaux) [[Four 04](#)]. De ce fait, la radiosensibilité des cellules qui dépend de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent au moment de l'irradiation (phénomène largement rapporté pour les photons), n'entre plus en jeu pour les hadrons. Une irradiation de haut TEL conduit à un arrêt du cycle prononcé et la mort cellulaire est déterminée par des arguments géométriques : les cellules en G2 seront les plus touchées car la taille du noyau est maximale à ce moment (2N chromosomes).

3. Il a été rapporté une dépendance moins importante de la réponse tumorale à son niveau d'hypoxie lorsqu'elle est irradiée par des ions lourds plutôt que par des photons. Des expériences rapportent des OER (Oxygen Enhancement Ratio) proches de 1.0 dans le cas de rayonnements de haut TEL tandis qu'un même traitement de bas TEL conduit à un OER de 2.5-3.0 [[Bare 63](#)]. Ces études montrent un intérêt particulier de la hadronthérapie pour le traitement des tumeurs hypoxiques.

4. Finalement, la thérapie par ions carbonés aurait un effet anti-angiogénique et anti-métastatique [Ogat 05]. Des études *in vitro*, sur des cellules endothéliales, montrent qu'il y a une diminution de la migration cellulaire ainsi qu'une inhibition du développement des vaisseaux après une irradiation par ions carbonés.

Du fait de son coût important et du peu de centres actuellement disponibles, tous les patients ne bénéficient pas aujourd'hui d'un tel traitement. Les principales indications sont les tumeurs aux localisations critiques (proches d'organes à risques, profondes et difficilement opérables). Les tumeurs de la base du crâne, de la tête et du cou sont de bons candidats pour la hadronthérapie.

SSRT : Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy : La dernière option présentée ici pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie, est la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (ou SSRT). Cette technique utilise des photons de basse énergie (de l'ordre de plusieurs dizaines de keV) et tire profit de l'augmentation de la probabilité d'interactions par effet photoélectrique de tels photons avec les atomes lourds ($Z > 30$) par rapport aux atomes légers (tissus biologiques typiquement). En injectant, avant l'irradiation, des atomes lourds spécifiquement dans la tumeur, on crée un différentiel de doses entre tissus sains et tissus tumoraux dont l'amplitude dépend de la concentration en atomes lourds et de leurs distributions. Cette technique sera décrite plus en détail dans le chapitre 3.3, p.54.

Chapitre 2

Conséquences biologiques d'une irradiation de photons

Sommaire

2.1	Interaction des photons dans la matière	26
2.1.1	Processus d'interaction des photons	27
2.1.2	Section efficace	28
2.1.3	Coefficients d'atténuation linéique et massique	29
2.2	Les électrons, vecteurs du dépôt d'énergie	31
2.2.1	Origine des électrons émis	31
2.2.2	Pouvoir d'arrêt	31
2.2.3	Transfert d'énergie linéique	32
2.3	Du dépôt d'énergie aux dommages biologiques	34
2.3.1	Quelques notions de dosimétrie	34
2.3.2	De l'importance de la microdosimétrie	34
2.3.3	Les dommages radio-induits	36
2.3.4	Survie clonogénique	39

La radiothérapie externe est une option thérapeutique intéressante pour le traitement des gliomes qui sont difficilement résécables par chirurgie (du fait de leur localisation dans le cerveau et de leur croissance diffuse) et pour lesquels la chimiothérapie est limitée par la présence de la barrière hémato-encéphalique. Ce chapitre présente les principales interactions des photons avec la matière et tente d'expliquer les conséquences du dépôt d'énergie qui s'en suit, sur la matière vivante.

2.1 Interaction des photons dans la matière

Les photons sont des particules directement ionisantes, ne possédant ni charge, ni masse. Ils possèdent un quantum d'énergie $h\nu$ ¹ et une célérité c dans le vide. On désigne par rayons X , les photons produits à l'extérieur du noyau, c'est-à-dire, dans le champ électromagnétique ou le cortège électronique qui l'entourent. On regroupe ainsi les photons de fluorescence (émis lors de transitions électroniques inter-couches) et le rayonnement de freinage résultant du ralentissement brutal d'une particule chargée dans le champ électromagnétique entourant un noyau (cf. 3.1.1, page 46). A l'inverse, les photons γ correspondent aux photons émis depuis un noyau ou de l'annihilation d'une particule matérielle.

Les photons interagissent avec les atomes de la matière selon des processus qui dépendent de leur énergie et de la cible rencontrée (numéro atomique et état). Ces interactions conduisent à une atténuation et à un changement de phase $\Delta\phi$ des ondes incidentes. La figure 2.1 illustre ces changements lorsqu'une onde E_B traverse un milieu homogène de longueur L .

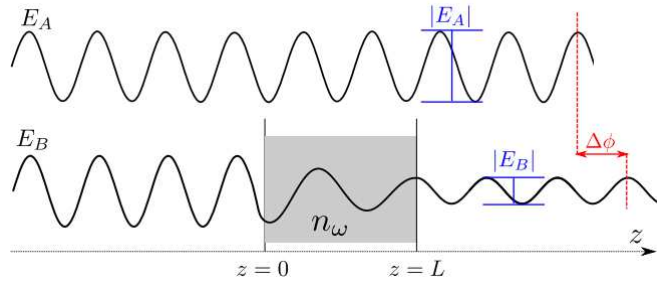


FIGURE 2.1 – Les ondes E_A et E_B proviennent d'un front d'ondes monochromatiques. L'onde E_A se propage sans perturbation dans le vide tandis que l'onde E_B traverse un milieu homogène de longueur L . L'amplitude $|E_B|$ et la longueur d'onde λ de E_B sont modifiées par le passage dans la matière.

L'atténuation et le décalage de phase sont décrits par l'indice de réfraction $n_\omega(x, y, z)$ du milieu traversé :

$$n_\omega(x, y, z) = 1 - \delta_\omega(x, y, z) + i\beta_\omega(x, y, z) \quad (2.1)$$

δ_ω et β_ω sont des quantités réelles qui dépendent du milieu et de la fréquence ω de l'onde. δ_ω représente la phase et β_ω , l'amplitude. Si l'on considère un champ d'ondes $E_0(x, y, z)$ se propageant selon z et traversant un milieu homogène de longueur L et d'indice de réfraction $n_\omega(x, y, z)$, le champ d'ondes à l'intérieur ou juste après le milieu se calcule :

$$E(x, y, z) = E_0(x, y, 0) \cdot e^{ik \int_0^z n_\omega(x, y, z) dz} = E_0(x, y, 0) \cdot e^{ik \int_0^z [1 - \delta_\omega(x, y, z)] dz} \cdot e^{-\int_0^z \beta_\omega(x, y, z) dz} \quad (2.2)$$

avec k , le nombre d'onde : $k = 2\pi/\lambda$ et λ , la longueur d'onde.

De cette équation, on retrouve d'une part, la loi de Beer-Lambert qui caractérise l'atténuation des rayons X par la matière :

$$\frac{I(x, y, z)}{I(x, y, 0)} = \frac{|E(x, y, z)|^2}{|E(x, y, 0)|^2} = e^{-2k \int_0^z \beta_\omega(x, y, z) dz} \quad (2.3)$$

1. h est la constante de Planck, $6.63 \cdot 10^{-34} J.s$ et ν la fréquence inhérente à la dualité onde-particule du photon.

où $2k\beta_\omega(x, y, z) = \mu_\omega(x, y, z)$, est le coefficient d'atténuation linéique défini à la section 2.1.3, page 29.

Et d'autre part, on retrouve le terme correspondant au changement de phase de l'onde suite à la traversée du milieu.

$$\Delta\phi(x, y, z) = k \int \delta_\omega(x, y, z) dz \quad (2.4)$$

La détection du changement de phase est à l'origine des techniques d'imagerie par contraste de phase qui permettent aujourd'hui de mettre en évidence des structures très fines dans des tissus mous, non visibles avec les méthodes d'imagerie X classiques. Cette technique a été utilisée dans ce travail de thèse pour la caractérisation tissulaire des tumeurs cérébrales. Nous reviendrons dessus à la partie 12.2.2.2, p.202.

2.1.1 Processus d'interaction des photons

Les principaux modes d'interaction des photons dans la matière sont énumérés dans le tableau 2.1 en fonction de la cible et du mode d'interaction (diffusion, absorption, effets multi-photoniques). Ces mécanismes sont maintenant bien connus et ont largement été décrits [Hubb 99] [Gerw 01]. Les processus indiqués en gras dans le tableau sont les plus fréquents. Ce sont eux qui participeront majoritairement au dépôt d'énergie dans le domaine énergétique de la radiothérapie.

L'effet photoélectrique : Le photon d'énergie incidente $h\nu$ interagit avec un électron d'une couche électronique interne de l'atome cible. L'énergie du photon est entièrement absorbée et l'électron est éjecté avec une énergie cinétique équivalente à la différence entre l'énergie incidente du photon et l'énergie de liaison de l'électron (E_l).

$$E_{e-} = h\nu - E_l \quad (2.5)$$

La diffusion Compton : Le photon incident ionise un atome sur ses couches électroniques externes (l'énergie de liaison de l'électron est faible devant celle du photon). Un photon diffusé est émis selon un angle θ par rapport à la direction du photon incident et avec une énergie $h\nu'$ inférieure à $h\nu$. L'angle de diffusion θ peut devenir grand quand l'énergie du photon incident est faible. L'électron éjecté récupère la différence d'énergie existante entre celle du photon incident et celle du photon diffusé (on néglige dans ce cas l'énergie de liaison de l'électron). Les lois de conservations de l'énergie et de la quantité de mouvement totales permettent de calculer de manière simple l'énergie de l'électron mis en mouvement (E_{e-}).

$$E_{e-} = h\nu - h\nu' = h\nu - \frac{h\nu}{1 + \frac{(1-\cos\theta)h\nu}{m_e \cdot c^2}} \quad (2.6)$$

avec m_{e-} , la masse de l'électron ($9.11 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$) et c , la célérité de la lumière dans le vide ($3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$).

La création de paires (e^-/e^+) : Elle se produit dans le champ électromagnétique du noyau de l'atome cible. Le photon incident est absorbé. On observe la génération d'une paire d'électron / positron (e^-/e^+). Ce processus ne peut avoir lieu que si l'énergie du photon incident est inférieure à deux fois l'énergie de masse de l'électron, soit 1.025 MeV . L'excédent d'énergie sera alors réparti sous forme d'énergie cinétique entre les deux particules générées. La création de paires peut

Interaction avec	Diffusion élastique	Diffusion inélastique	Absorption	Effets multi-photoniques
Electrons de l'atome	Effet Thomson	Effet Compton	Effet photo-électrique	Effet Compton double
Nucléons	Diffusion nucléaire élastique ($\gamma\gamma$)	Diffusion nucléaire inélastique ($\gamma\gamma'$)	Réaction photonucléaire (γ, n) (γ, p), photofission, <i>etc.</i>	
Champ électrique entourant des particules chargées	Diffusion Zelbruck		Production de paire ($e^- - e^+$) dans le champ d'un noyau ou d'un électron	
Mésons			Production de paire nucléon-antinuéon ou de photomésons (ne se produit pas aux énergies de la RT)	

TABLE 2.1 – Processus des interactions photons/matière. Adapté de [Blan 97].

également avoir lieu dans le champ d'un électron. Dans ce cas, le seuil énergétique est plus élevé : $4m_e c^2$ (2.04 MeV) et l'électron recule avec une énergie cinétique importante.

2.1.2 Section efficace

L'interaction des particules est uniquement régie par des lois de probabilités. La notion de section efficace apparait rapidement après la découverte du noyau par *Rutherford* en 1911. Cette grandeur décrit la probabilité d'interaction des particules dans un environnement donné. Elle s'exprime par unité de surface (en cm^2 ou *barn*, avec la relation : $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$).

$$\sigma = \frac{P}{N} \quad (2.7)$$

où P est la probabilité que possède un atome cible d'interagir et N est la densité surfacique d'atomes cibles (cm^2).

La section efficace totale (σ_{tot}) dépend des sections efficaces propres à chaque processus d'interaction. Ainsi, $\sigma_{tot} = \sigma_{PE} + \sigma_C + \sigma_\pi + \sigma_R + \dots$ où σ_{PE} , σ_C , σ_π et σ_R sont les sections efficaces associées à l'effet photoélectrique, la diffusion Compton, la création de paires et la diffusion Rayleigh, respectivement. La figure 2.2(a) illustre les prédominances des principaux processus d'interaction en

fonction du numéro atomique Z de l'atome cible et de l'énergie E des photons incidents. L'effet photoélectrique est majoritaire à basse énergie (keV) et d'autant plus pour des atomes de Z élevé, tandis que la diffusion Compton devient prédominante pour des énergies plus grandes (MeV).

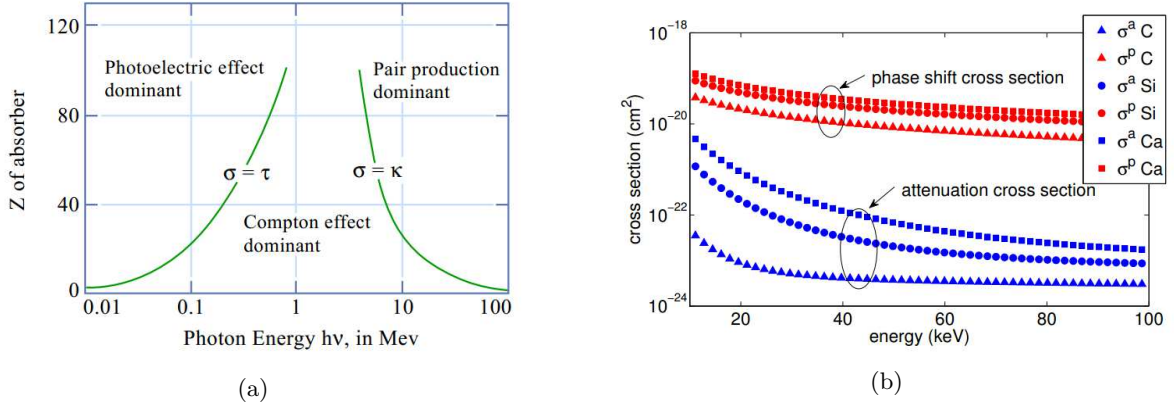


FIGURE 2.2 – (a) Prédominance des principaux processus d'interaction des photons dans la matière en fonction de leur énergie et du numéro atomique Z de la cible. Figure adaptée de [Abde 10]. (b) Sections efficaces de phase σ^p et d'atténuation σ^a pour trois éléments de faible Z : C ($Z = 6$), Si ($Z = 14$) et Ca ($Z = 20$) calculées dans la gamme énergétique 15-100 keV . Figure extraite de [Zane 11].

La section efficace décrit l'intégralité du phénomène d'interaction. Elle se décompose donc en deux grandeurs : la section efficace d'atténuation (σ^a) et la section efficace de phase (σ^p). La figure 2.2(b) représente ces deux composantes pour trois éléments légers (C, Si et Ca) dans la gamme énergétique 15-100 keV . On notera que la section efficace de phase pour les éléments de faible Z est relativement constante avec l'énergie des photons (donc moins affectée que l'atténuation par une augmentation d'énergie). De plus, elle est deux ordres de grandeur plus importante que la section efficace d'atténuation, ce qui offre la possibilité de détecter des changements de phase sensibles. La tomographie par contraste de phase s'appuie sur ces deux propriétés.

2.1.3 Coefficients d'atténuation linéique et massique

La section efficace est directement reliée au coefficient d'atténuation linéique (μ) (ou coefficient d'atténuation massique (μ/ρ)), qui décrit la façon dont un faisceau de photons d'énergie E est atténué dans un environnement de masse volumique ρ (cf. Loi de Beer-Lambert, page 26).

$$\mu = \sigma \cdot n \quad (cm^{-1}) \quad (2.8)$$

avec n , le nombre de cibles par unité de volume (cm^{-3}). Les figures 2.3(a), 2.3(b), 2.3(c) et 2.3(d) présentent l'évolution des coefficients d'atténuation massiques (μ/ρ , en $cm^2.g^{-1}$) dans l'eau, le gadolinium, l'or et la platine respectivement, en fonction de l'énergie des photons incidents.

Les transitions brutales des coefficients d'atténuation massique observées pour les atomes lourds correspondent aux seuils énergétiques des couches électroniques K, L et M. Lorsque l'énergie des

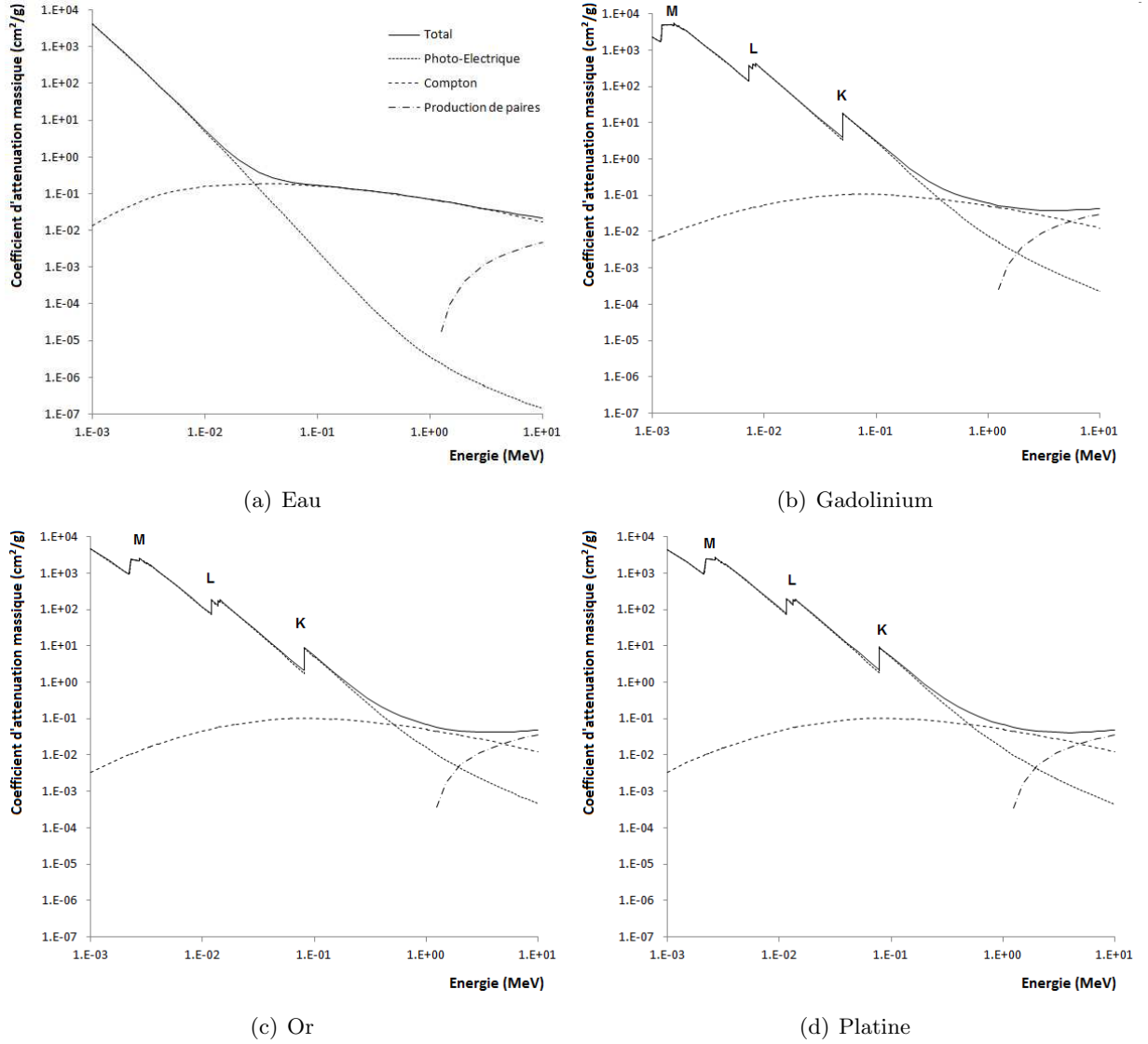


FIGURE 2.3 – Coefficients d'atténuation massique (μ/ρ) des photons dans (a) l'eau ($Z_{eff} = 6$), (b) le gadolinium ($Z = 64$), (c) l'or ($Z = 79$) et (d) le platine ($Z = 78$). Données issues de NIST XCOM.

photons incidents est supérieure à ces seuils, l'effet photoélectrique devient possible sur ces couches électroniques, conduisant à une forte augmentation de la probabilité d'interactions. Le coefficient d'atténuation englobe les deux processus d'absorption et de diffusion des photons. Pour les distinguer, on introduit respectivement les grandeurs μ_{ab} et μ_{diff} .

2.2 Les électrons, vecteurs du dépôt d'énergie

2.2.1 Origine des électrons émis

Nous l'avons vu dans la partie précédente, les photons ne sont pas les vecteurs directs du dépôt d'énergie. Quelque soit le processus d'interaction, les photons mettent en mouvement des électrons, qualifiés de secondaires, en leur cédant tout ou partie de leur énergie. Ces électrons vont à leur tour interagir jusqu'à céder la totalité de leur énergie au milieu.

Les électrons directement issus de l'ionisation des atomes par les photons primaires sont appelés photoélectrons. La lacune électronique qu'ils créent nécessite d'être rapidement comblée. Un électron d'une couche supérieure s'en charge et la transition $e_j^- \rightarrow e_i^-$ s'accompagne d'une libération d'énergie W_{ij} . Cette énergie peut être matérialisée par l'apparition d'un photon de fluorescence (désexcitation radiative) ou directement transférée à un autre électron (désexcitation non radiative) qui sera à son tour éjecté de l'atome (si l'énergie transmise est supérieure à l'énergie de liaison de l'électron). Dans ce cas, le processus de réarrangement du cortège se répète et on observe une cascade d'électrons, qu'on appelle cascade Auger. Ces électrons emportent une énergie cinétique qui correspond à la différence des potentiels énergétiques des couches électroniques concernées. Cette différence est petite. Les électrons Auger ont un faible parcours (de l'ordre de quelques nm) et déposent leur énergie localement autour du point d'interaction. Cette cascade d'électrons permet de concentrer le dépôt d'énergie à l'échelle microscopique et est souvent exploitée dans le but de complexifier la nature des dommages radio-induits, en curiethérapie notamment [Nath 90]. La probabilité de désexcitation non radiative a été calculée par Krause. La figure 2.4 la représente après création d'une lacune électronique en couches K , L_I , L_{II} et L_{III} , en fonction du numéro atomique des éléments. La probabilité d'émission Auger à la suite d'une ionisation en couche K est largement favorisée pour les éléments de Z inférieur à 30. Par exemple, les probabilités de désexcitation non radiative à la suite d'une ionisation en couche K dans le calcium ($Z = 20$) et dans l'or ($Z = 79$), valent 85 et 4% respectivement. L'émission de photons de fluorescence est donc largement majoritaire pour les atomes lourds.

Les électrons (photoélectrons ou Auger), interagissent soit par diffusion (élastique ou inélastique) qui entraîne un faible transfert d'énergie, soit par collisions sur les électrons périphériques du cortège électronique (transfert d'énergie important), soit dans le champ électromagnétique entourant le noyau, produisant alors du rayonnement de freinage (cf. 3.1.1, p. 46). La probabilité d'observer ce dernier phénomène aux énergies de la radiothérapie est cependant très faible.

2.2.2 Pouvoir d'arrêt

Dans le domaine énergétique qui nous intéresse, la perte d'énergie des électrons par unité de longueur (ou pouvoir d'arrêt $(\frac{dE}{dx})$, en $MeV.cm^2.g^{-1}$) est principalement due aux processus collisionnels qui mettent en mouvement d'autres électrons jusqu'à la perte de la totalité de l'énergie de départ [Berg 99]. Le pouvoir d'arrêt est estimé par la formule de Bethe-Bloch :

$$\left[\frac{dE}{dx} \right]_{coll} = \left(\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \right)^2 \frac{4\pi e^4}{m_e v^2} N Z B \quad (2.9)$$

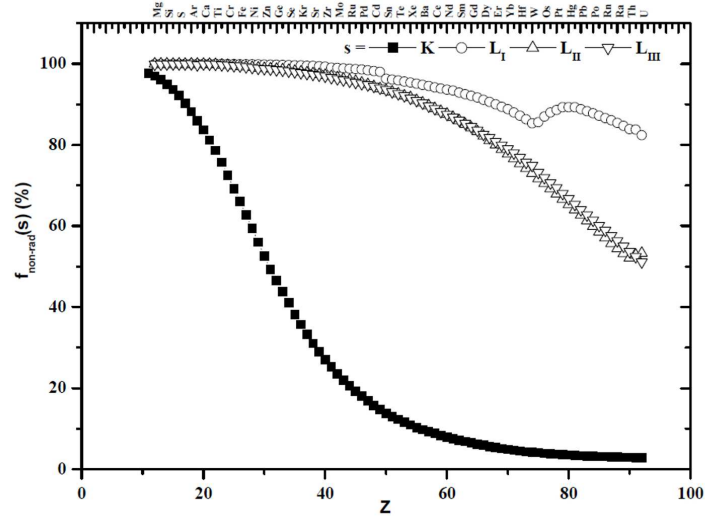


FIGURE 2.4 – Probabilités de désexcitation non radiative après création d'une lacune électronique en couches K , L_I , L_{II} et L_{III} , pour les différents éléments de la classification périodique [Krau 79].

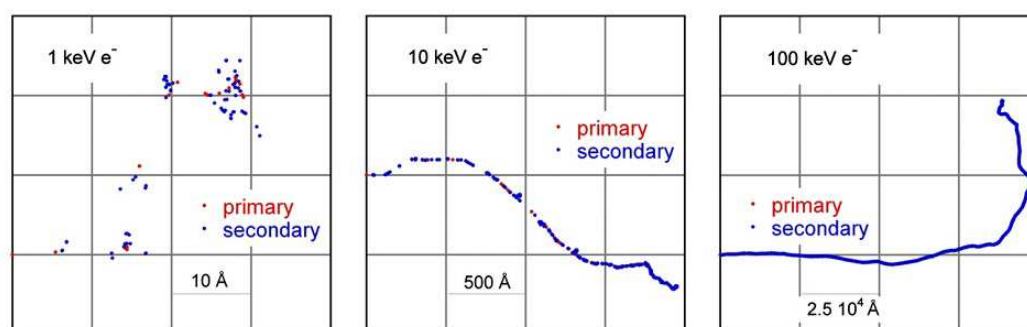
Avec $B = \left[2 \ln \frac{2m_e v^2}{I} - \ln \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right) - \frac{v^2}{c^2} \right]$.

v est la vitesse de l'électron incident ($m.s^{-1}$), c , la vitesse de la lumière dans le vide ($m.s^{-1}$), m_e , la masse de l'électron (g), N , la densité atomique de la cible (cm^{-3}), Z , le numéro atomique et I , l'énergie d'excitation moyenne pour l'ensemble des électrons de l'atome (MeV). Le pouvoir d'arrêt est inversement proportionnel au carré de la vitesse de la particule, donc plus celle-ci diminue, plus la part d'énergie cédée au milieu par unité de longueur est grande. Ainsi, le dépôt d'énergie est plus concentré en fin de parcours qu'au début. La figure 2.5(a) illustre les traces électroniques produites dans l'eau par des électrons de 1, 10 et 100 keV . Les électrons de très basse énergie produisent des *grappes d'ionisations*, régions nanométriques dans lesquels le dépôt d'énergie, lié à une forte densité d'ionisations, est concentré.

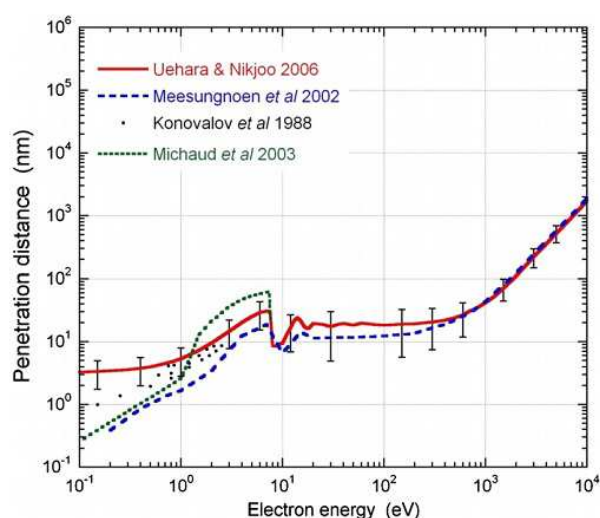
2.2.3 Transfert d'énergie linéique

Le Transfert d'Énergie Linéique (TEL) a été introduit pour distinguer les électrons secondaires de la trace principale. Ce n'est pas une quantité mesurable, elle se calcule. Elle correspond à la quantité d'énergie transférée par les électrons au milieu, par unité de longueur, en fonction d'un seuil énergétique Δ préalablement fixé pour préciser la population d'électrons suivis. Pratiquement, si l'énergie de l'électron est inférieure à Δ , il sera confondu avec la trace principale. Si elle est supérieure, on le distinguera de la trace primaire et l'électron sera suivi à nouveau. Δ est appelé énergie de coupure. Lorsque Δ tend vers 0, le TEL est égal au pouvoir d'arrêt des électrons ($\frac{dE}{dx}$).

$$TEL = \left[\frac{dE}{dx} \right]_{\Delta} \quad (2.10)$$



(a)



(b)

FIGURE 2.5 – (a) Traces d'énergie produites par des électrons de 1, 10 et 100 keV dans l'eau. Les électrons de très faible énergie ($\leq 1keV$) forment des grappes d'ionisations. (b) Pénétration des électrons entre 0.1 eV et 10 keV dans l'eau [Nikj 10].

Le TEL est très souvent utilisé pour décrire la qualité d'un rayonnement. Les rayonnements de particules (α , p , C , ...) sont des rayonnements de haut TEL, tandis que les rayonnements de photons sont qualifiés de bas TEL.

Le parcours moyen des électrons dans la matière est connu en fonction de leur énergie et du matériau traversé. Ces données sont tabulées et disponibles sur le site du NIST². La figure 2.5(b) indique les valeurs dans l'eau.

2. NIST : National Institute of Standards and Technology : <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Star/Text/ESTAR.html>.

2.3 Du dépôt d'énergie aux dommages biologiques

2.3.1 Quelques notions de dosimétrie

L'énergie transmise à un milieu, qu'il soit biologique ou non peut/doit être quantifiée pour de nombreuses raisons (radioprotection, mesure de dose pour la radiothérapie, radioactivité naturelle...). En radiothérapie conventionnelle, la dosimétrie est majoritairement réalisée de manière macroscopique, c'est-à-dire en considérant un dépôt de dose uniforme dans un volume de l'ordre du cm^3 .

Le *Kerma* (Kinetic Energy Released per unit MAss) représente l'énergie cinétique transférée au milieu par le rayonnement primaire.

$$K = \Phi \overline{E_{tr}} \left(\frac{\mu_{tot}}{\rho} \right) = \Phi \overline{E} \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right) \quad (2.11)$$

Où E_{tr} est l'énergie transmise aux électrons du milieu (J), E est l'énergie des particules incidentes (J) et $\frac{\mu_{tot}}{\rho}$ et $\frac{\mu_{tr}}{\rho}$ sont les coefficients d'atténuation massique total et de transmission ($cm^2.g^{-1}$). Le *Kerma* s'exprime en $J.kg^{-1}$ ou Gray (Gy). Toute l'énergie transmise n'est pas nécessairement absorbée par le milieu (cela dépend du parcours des électrons mis en mouvement et de la taille du volume considéré). L'énergie absorbée E_{ab} correspond à l'énergie déposée par les électrons secondaires dans le volume d'intérêt :

$$E_{ab} = R_{in} - R_{ex} + \Sigma Q \quad (2.12)$$

Où R_{in} correspond à l'énergie radiante incidente, c'est-à-dire la somme de toutes les énergies (hors énergie de masse) de toutes les particules ionisantes qui pénètrent dans le volume. R_{ex} est l'énergie des particules qui sortent du volume. ΣQ représente la somme de toutes les modifications de l'énergie de masse des noyaux et particules qui résultent des transformations qui se produisent dans le volume. La dose absorbée (quantité utile en radiothérapie) représente la quantité d'énergie déposée par unité de masse dans le volume considéré. Elle possède la même unité que le *Kerma*, le Gy .

$$D = \frac{dE_{ab}}{dm} \quad \text{avec } dm, \text{ la masse de l'élément de volume considéré} \quad (2.13)$$

2.3.2 De l'importance de la microdosimétrie

La notion de dose absorbée atteint vite une limite lorsque dm devient petit. En effet, à l'échelle microscopique (si l'on considère une cellule ou son noyau par exemple), la grandeur $z = \frac{dE_{ab}}{dm}$ se met à fluctuer d'autant plus fortement que dm diminue. La figure 2.6 illustre le comportement de z en fonction de dm . z est une grandeur stochastique qui répond à une densité de probabilité ($f(z)$).

$$z = \int_0^{\inf} z \cdot f(z) \cdot dz \quad (2.14)$$

La dose en un point devient une grandeur mathématique définissable qui correspond à la limite de \bar{z} quand dm tend vers 0. \bar{z} est la valeur moyenne de z , non stochastique et $f(z)$ est la dérivée par rapport à z de $F(z)$, fonction de distribution de z ou encore probabilité que possède l'énergie E_{ab} d'être inférieure ou égale à z .

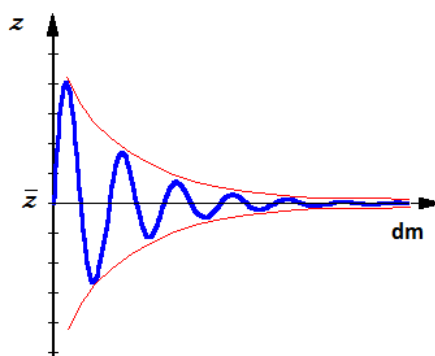


FIGURE 2.6 – Représentation schématique de la grandeur $z = \frac{dE_{ab}}{dm}$.

Mais quel est l'intérêt de la microdosimétrie ?

La notion de microdosimétrie devient essentielle pour prédire la réponse biologique induite par un dépôt de dose non homogène. L'énergie déposée n'est plus une simple valeur, c'est maintenant une trace dont la forme dépend des paramètres cités plus haut (type et énergie de la particule et nature du milieu irradié). La trace d'énergie doit être mise en rapport avec sa localisation dans la cellule pour interpréter son efficacité biologique (cf. Fig. 2.7(a)).

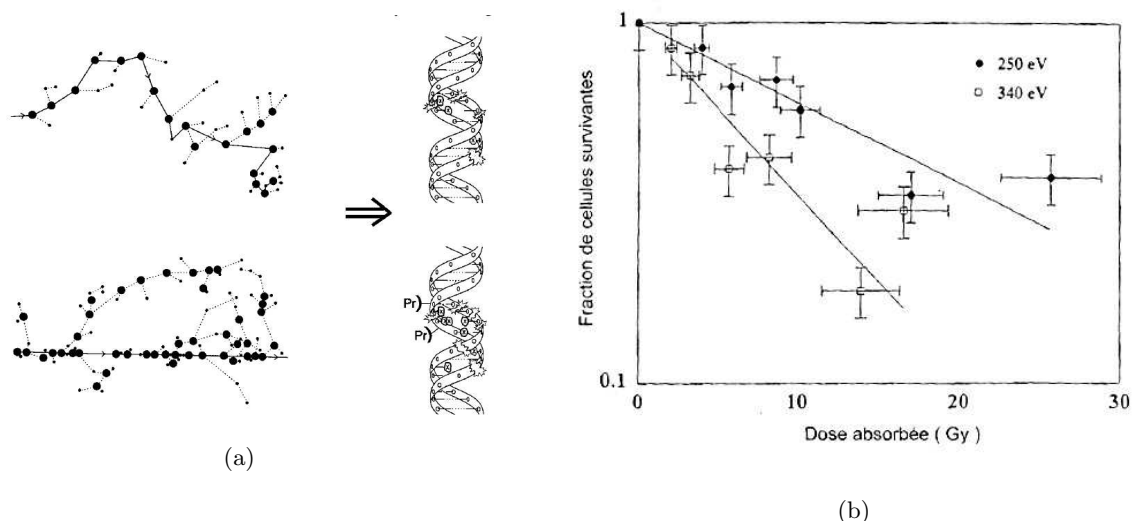


FIGURE 2.7 – (a) Trajectoires d'un électron de 500 eV (en haut) et d'une particule α de 4 MeV (en bas) simulées par méthode Monte Carlo et représentées à l'échelle de l'ADN. Les gros points représentent les ionisations. Les petits points représentent les excitations [Good 99]. (b) Survie des cellules V79 suite à une irradiation X de 250 et 340 eV, énergies correspondant aux limites inférieures et supérieures du seuil K du Carbone présent dans le noyau des cellules [Penh 10].

En effet, une grappe d'ionisations dense n'aura d'effets biologiques que si elle est produite au niveau de l'ADN ou d'autres cibles impliquées dans la viabilité cellulaire. L'étude de *Hervé du Penhoat* sur les événements en couche K observés sur les atomes de carbone présents dans le noyau des cellules, donne un exemple intéressant. Des cellules V79 de hamster chinois ont été irradiées par des rayons X de 340 et 250 eV correspondant aux énergies supérieure et inférieure au seuil K du carbone respectivement. A 340 eV, l'effet photoélectrique en couche K prédomine. Le réarrangement électronique conduit à l'émission de cascades Auger (plus probable que l'émission de fluorescence dans le cas des éléments légers présents dans les tissus biologiques : 90% d'émissions Auger environ (cf. Fig. 2.4)). Ces électrons de faible énergie ont un parcours très faible (quelques nm) et conduisent à une forte augmentation de la densité d'ionisations au niveau de l'ADN. *Hervé du Penhoat* mesure cette augmentation via la survie clonogénique des cellules (cf. Fig. 2.7(b)). Un facteur 2 est mesuré entre les deux énergies d'irradiation (l'irradiation à 340 eV étant la plus délétère). Cette différence correspond au rapport d'ionisations de cœur produites sur l'ADN aux deux énergies considérées, et donc au taux d'électrons Auger émis dans le noyau des cellules.

2.3.3 Les dommages radio-induits

L'interaction des particules ionisantes dans la matière vivante conduit à la formation de dommages qui sont gérés de manière plus ou moins efficace par les cellules (selon leurs complexités et localisations). L'ADN est souvent considéré comme la cible la plus critique. L'ADN est en effet le vecteur des propriétés génétiques et métaboliques de chaque cellule. Des dommages complexes ont des conséquences directes sur leur intégrité [Wall 98]. La grande majorité des études sur le sujet ne traite que de l'ADN nucléaire. On notera cependant qu'une petite partie d'ADN est localisée dans les mitochondries et code pour quelques protéines particulières. Les interactions sont distribuées de manière aléatoire dans les cellules et ne touchent donc pas uniquement l'ADN. Les conséquences des dommages induits à d'autres cibles (membranes, organites, protéines, *etc*) sont nettement moins référencées. Dans cette partie, nous allons décrire les principaux modes de dommages que peut subir l'ADN et nous verrons comment les rayonnements ionisants altèrent le fonctionnement des cellules.

2.3.3.1 Les lésions de l'ADN

L'ADN est une molécule dynamique qui subit des modifications de structure et d'architecture en permanence (même en l'absence de stress extérieur). Les différentes sources de lésions de l'ADN sont :

1. Le métabolisme oxydatif³ qui engendre chaque jour et par cellule, quelques 10000 dommages de bases, 55000 cassures simple brin, 8 cassures double brins et 8 pontages [Burk 99]. Il en résulte que les cellules possèdent des systèmes de défenses enzymatiques antiradicalaires et antioxydants efficaces puisque ces dommages n'affectent pas leur intégrité.

2. Les altérations épigénétiques de l'ADN, la plus importante étant la méthylation. *Mullaart* et ses collaborateurs ont montré que plusieurs milliers de dommages de bases par cellule et par jour, résultaient de la méthylation sur différentes positions de l'ADN [Mull 91]. Cette transformation chimique permet en général de préserver le profil transcriptionnel de la cellule et protège le génome contre la mobilité de séquences répétitives. Cependant, une méthylation aberrante de l'ADN engendre une instabilité génomique. L'apparition d'un cancer peut être associée à une hy-

3. Le métabolisme oxydatif fournit de l'énergie au système cellulaire via la création d'espèces réactives de l'oxygène.

prométhylation globale du génome ou à une augmentation ou diminution spécifique des méthylations sur certains gènes (gènes suppresseurs de tumeur notamment) [Duca 06].

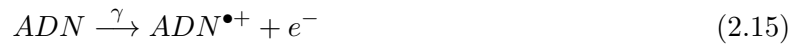
3. Les lésions de l'ADN peuvent aussi être engendrées par un stress extérieur, comme les agents radiomimétiques ou les rayonnements ionisants. Dans ce cas, la nature des dommages peut être extrêmement variable. Ces lésions ont maintenant beaucoup été étudiées. On distingue les cassures simple brin (CSB), les cassures double brins (CDB), les altérations de bases pyrimidiques et puriques, les destructions des sucres, les sites abasiques, les pontages intra ou interbrins ADN/ADN, les pontages ADN/protéines et les dommages multiples localisés (LMDS) [Good 94] [Ward 95]. Nous avons vu précédemment qu'à l'état naturel, les cellules subissent continuellement de nombreux dommages à l'ADN. Elles ont par conséquent développé des systèmes de réparation efficaces pour les réparer. Les dommages complexes auront des conséquences plus importantes. *Nikjoo* et ses collaborateurs montrent que les CDB et les LMDS sont les principales responsables des effets délétères de l'irradiation [Nikj 01].

Les CDB correspondent à une rupture des deux chaînes d'ADN à des sites distants de quelques nucléotides. Les rayonnements ionisants de faible TEL induisent environ 40 CDB/Gy sur les cellules de mammifères. Leur taux d'apparition est linéaire avec la dose [Iia 91]. Elles proviennent de dommages directs ou de l'action d'un radical $\bullet OH$ créant une première lésion sur un désoxyribose puis une seconde sur le second brin par transfert du radical, ou de l'attaque de l'ADN par plusieurs radicaux hydroxyles formés sur la trajectoire de la même particule, dans des sites voisins [Diko 98].

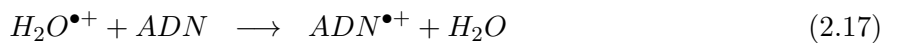
Les LMDS sont les cassures associées à des dommages oxydatifs de bases à une distance de 10 à 20 nucléotides [Ward 88]. Ils sont induits par les rayonnements ionisants lorsque la densité d'ionisations est grande ou par des agents radiomimétiques comme la bléomycine. Leur taux d'occurrence est assez discuté. *Nikjoo* avance des taux de l'ordre de 30 à 40% dans le cas de rayonnements de faible TEL et jusqu'à 95% dans le cas de rayonnements de haut TEL [Nikj 01]. D'autres études montrent des résultats beaucoup plus faibles [Bouc 06]. Du fait de leur complexité, la réparation est moins bien gérée par les cellules. Cela conduit soit à la mort cellulaire, soit à l'apparition de mutations qui peuvent générer un cancer.

2.3.3.2 Origine des lésions radio-induites de l'ADN

Les lésions de l'ADN peuvent être directes :



quasi-directes :



ou indirectes :



Un dommage est qualifié de direct lorsque la structure de l'ADN est modifiée par la particule ionisante elle-même, sans l'intervention d'aucune espèce intermédiaire. Les dommages quasi-directs et indirects résultent de la transformation chimique de l'eau (ou radiolyse) qui représente 70 à 80% en poids, du matériel biologique. Ces transformations sont principalement des réactions d'oxydo-réduction mono électroniques. Un électron est arraché aux molécules dans un intervalle de temps très court après irradiation ($\simeq 10^{-16}$ s). Les réactions radicalaires sont favorisées dans les zones de forte densité d'ionisations (ou grappes d'ionisations). La recombinaison des radicaux entre eux y est très probable :



Ainsi, au bout de quelques dizaines de nanosecondes, des espèces radicalaires ($\bullet OH$, e_{aq}^- et H^\bullet) et des espèces non radicalaires (H_2O_2 , H_2 et H^+), toutes très réactives, diffusent hors des grappes d'ionisations. Elles engendrent des lésions sur les cibles biologiques et l'ADN notamment. Les radicaux $\bullet OH$ sont les plus toxiques.

Dans le cas d'une irradiation de faible TEL (X ou γ), environ 40% des dommages sont induits directement tandis que 60% sont dûs à des effets indirects [Tubi 08].

2.3.3.3 Radiosensibilité et cycle cellulaire

Les cellules n'ont pas toute la même radiosensibilité, *i.e* la même réponse à une irradiation donnée. Cela dépend de leur propre identité et plus précisément, des gènes et protéines qu'elles expriment et qui leurs confèrent leurs capacités de réparation ainsi que leur résistance aux stress extérieurs [Ruiz 94].

D'autre part, la radiosensibilité des cellules n'est pas constante dans le temps. Toutes les cellules eucaryotes évoluent selon un cycle bien précis, depuis leur naissance jusqu'à leur prochaine division. Ce cycle cellulaire se compose de quatre étapes définies : G1, S, G2 et M, qui se suivent et se répètent avec une fréquence propre à la lignée cellulaire (cf. Fig. 2.8).

La phase G1 (*gap1*) est une phase de croissance et d'accumulation de réserves à la suite de la mitose ou d'une période de quiescence (G0). La phase S (*synthèse*) correspond à la duplication de la totalité du génome. Elle est suivie d'une période de réorganisation et de contrôle de son intégrité : la phase G2 (*gap2*), qui précède la mitose (condensation et migration des chromosomes avant la séparation de deux cellules filles). Entre les différentes phases d'un cycle, existent des points de contrôle, qui permettent aux mécanismes de réparation d'œuvrer pour prévenir les anomalies de réparation (G1/S) ou les aberrations chromosomiques (G2/M). Si des anomalies sont détectées à la suite d'une irradiation, les cellules s'accumulent dans une phase de contrôle. Cette altération du cycle est qualifiée de redistribution radio-induite. Toutes les cellules de mammifères (sauf celles qui portent une forme mutée de ATM⁴) observent ainsi un arrêt post-irradiation en G2 (environ 1h/Gy) qui est corrélé à la présence de lésions non réparées à l'approche de la mitose. Très souvent, on observe également un arrêt transitoire en S et un arrêt en G1 qui pourra prendre un caractère

4. protéine impliquée dans la réparation des CDB.

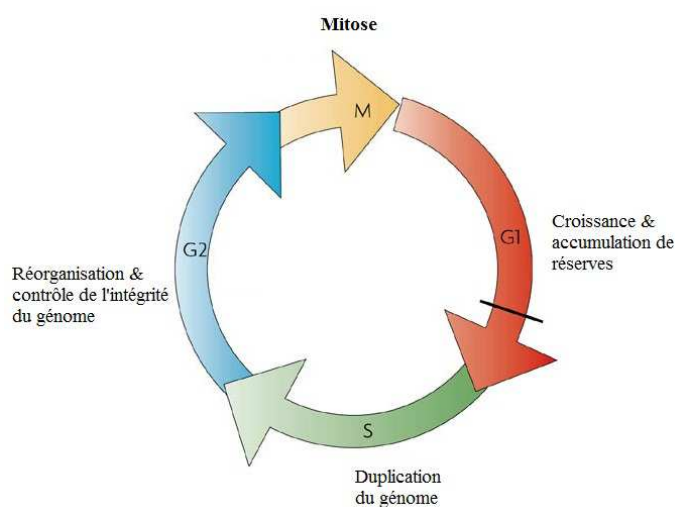


FIGURE 2.8 – Représentation schématisée du cycle cellulaire [Deha 07].

définitif et évoluer vers une mort cellulaire programmée (sénescence). Cet arrêt définitif permet de ne pas propager les anomalies génétiques. Pour les cellules qui portent une forme instable de ATM ou de p53, l'arrêt définitif n'est plus possible et l'instabilité du génome augmente. Aux faibles doses, la probabilité d'apparition de dommages radio-induits (évoluant selon une loi de Poisson) varie fortement entre les cellules. En effet, à l'échelle cellulaire, le dépôt de dose peut être très grand comme très petit, entraînant une importante variation de la réponse cellulaire.

De nombreuses études montrent qu'il existe un lien entre radiosensibilité et phase du cycle dans laquelle se trouvent les cellules irradiées. Dès les années 60, des études montrent que la plupart des cellules de mammifères observe une sensibilité accrue lorsqu'elles sont en G2/M et un maximum de radiorésistance en phase S [Sinc 66] [Tera 63]. La radiosensibilité en G1 est plus discutée. Elle dépend fortement de la lignée cellulaire et peut y être élevée [Sinc 68]. La figure 2.9 donne un exemple pour les cellules humaines du rein, fortement radiorésistantes en S et plus radiosensibles en G2 qu'en G1. Les raisons de ces différences ne sont pas encore tout à fait claires mais des propositions ont été publiées récemment. Entre les phases G1 et S, l'initiation des fourches de réplication entraîne une instabilité de la chromatine. Cela conduirait à l'augmentation de la radiosensibilité entre ces deux phases. A l'inverse, les capacités de réparation sont maximales en phase S (réparation par recombinaison optimale pour compenser les erreurs de réplifications conduisant aux CDB spontanées). Cela explique la radiorésistance observée dans cette phase. L'hyper radiosensibilité en mitose serait liée à un fort taux de cassures chromosomiques non réparées [Vile 06].

2.3.4 Survie clonogénique

Les techniques pour mesurer *in vitro*, les conséquences de l'irradiation d'une population cellulaire sont nombreuses et très variables. Nous ne les détaillerons pas toutes ici, mais il reste intéressant de les mentionner pour préciser les intérêts de chacune.

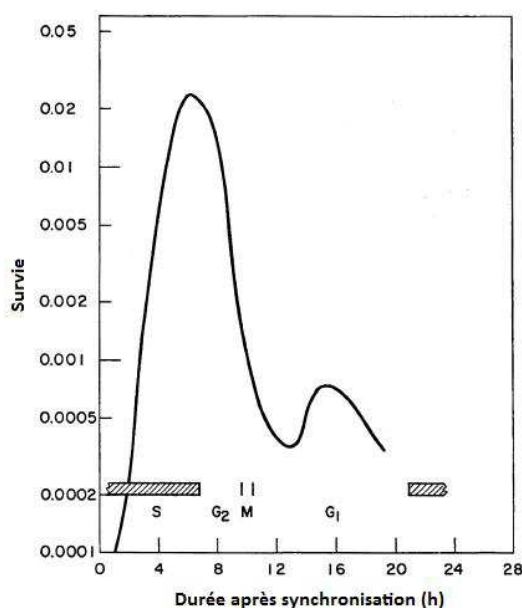


FIGURE 2.9 – Survie cellulaire de cellules humaines de rein en fonction de la phase du cycle dans laquelle elles se trouvent au moment de l'irradiation [Pawl 04].

Nous l'avons compris, les dommages les plus étudiés sont ceux de l'ADN. Plusieurs techniques existent pour les mettre en évidence. La méthode des comètes, par exemple, permet de quantifier la migration des fragments d'ADN formés à la suite d'une irradiation. Plus les fragments sont petits, plus la migration est importante, indiquant que les dommages (CSB, CDB et LMDS) sont nombreux. Plus spécifique des cassures double brins, le marquage fluorescent des sites intranucléaires portant une forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ H2AX) permet une quantification des CDB radio-induites. Étant donné la responsabilité des CDB dans la mort cellulaire, cette technique est aujourd'hui très utilisée. Cependant, il faut noter qu'elle n'est pas toujours utilisable. Les cellules au génome instable (lignées immortalisées de cellules tumorales essentiellement) peuvent présenter un taux de base de γ H2AX très important qui ne permet pas la détection des CDB radio-induites. Lors de ce travail de thèse, nous avons par exemple observé la difficulté de détecter des CDB par la méthode γ H2AX sur les cellules F98 (gliome de rat).

Il existe encore d'autres méthodes, plus anciennes, qui permettent de mettre en évidence les conséquences nucléaires d'une irradiation. La méthode de détection des aberrations chromosomiques permet de détecter les modifications structurales des chromosomes (CSB, CDB, réappariement, dicentrie...). Une autre technique permet quant à elle de quantifier l'apparition des micronoyaux (fragments de chromosomes ou chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose). Ces micronoyaux, distincts du noyau principal, proviennent de cassures chromosomiques ou d'anomalies du fuseau mitotique, responsables de l'apparition de mutations stables et héréditaires.

La détection des dommages de l'ADN ne donne pas d'information directe sur la survie des cellules. Or, lorsqu'on parle de radiothérapie, cette information reste le principal critère permettant de caractériser l'efficacité d'un traitement. En effet, une cellule tumorale qui aurait perdu sa capacité à

proliférer n'est plus "inquiétante". Cette caractéristique apparaît quelques heures voire quelques jours après l'irradiation. Il intervient à la suite de plusieurs étapes (modification de l'expression de gènes ou de l'expression de protéines, altération du cycle cellulaire, mutation et/ou aberration chromosomique, modification du phénotype puis mort cellulaire), si la cellule n'a pu réparer ses dommages. *Badie* et ses collaborateurs montrent qu'une simple CDB non réparée 24h après irradiation, peut conduire à la mort cellulaire [Badi 95].

Cinq processus de mort cellulaire ont été mis en évidence : La mort immédiate, la sénescence, la mort mitotique, l'apoptose et l'autophagie. Les proportions des différents processus dépendent de la dose et de l'expression de certains gènes. La perte de l'intégrité de la protéine p53 (dans les cellules tumorales essentiellement) conduit ainsi souvent à une mort mitotique (nécrose) correspondant à un processus de mort différée non programmée. La mort différée (fréquente à la suite d'une irradiation) est compatible avec un taux de survie élevé. Les cellules ayant subi des lésions bénignes échappent dans un premier temps à l'élimination opérée par la mort cellulaire, mais une forte instabilité génomique apparaît et évolue au fur et à mesure des générations. Une proportion variable de cellules meurt plusieurs générations après l'exposition aux rayonnements. Cela conduit à l'apparition de microcolonies (cf. Fig. 2.10(b) - [Pone 00]).

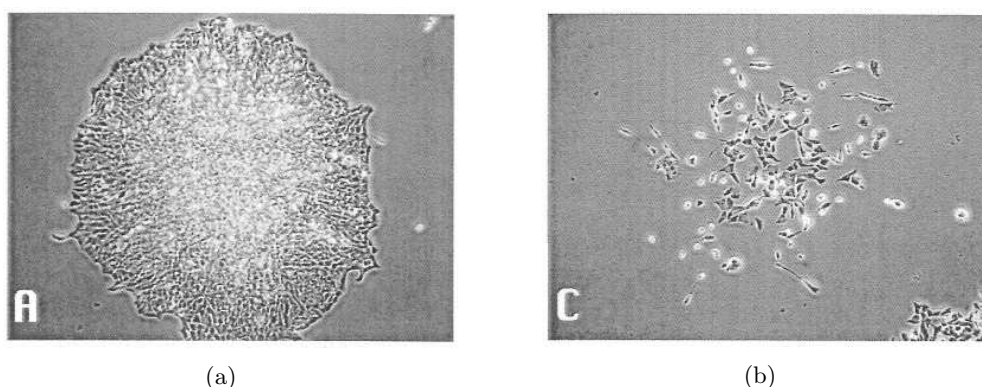


FIGURE 2.10 – Images en contraste de phase de (a) une colonie normale et (b) une micro-colonie diffuse. Les cellules V79 ont été exposées à des rayons γ (5 Gy) et sont observées 7 jours après. Les colonies diffuses contiennent quelques cellules seulement et présentent une apparence hirsute avec des cellules étalées et des restes nécrotiques [Pone 00].

Le protocole de mesure de la survie clonogénique de lignées immortalisées est maintenant bien établi. Nous le décrirons dans la partie 6.3.1, page 93. Les premières courbes de survie *in vitro* ont été décrites par *Puck et Marcus* [Puck 56]. Ils montrent pour la première fois une différence de radiosensibilité entre les lignées étudiées. La modélisation mathématique de la courbe de survie est apparue plus tard avec des interprétations parfois remises en question. Elle permet la comparaison des résultats entre eux. Par convention, la survie cellulaire est représentée dans un espace semi-logarithmique et se limite souvent aux trois premiers logarithmes, car à fortes doses, on observe des effets contradictoires (souvent dus à la présence d'aberrations chromosomiques dans des cellules survivantes).

Une irradiation de rayons X ou γ (aux forts débits de dose $\geq 1 \text{ Gy/min}$) donne souvent une courbe d'allure convexe qui peut être ajustée par une fonction linéaire quadratique (LQ) (cf. Fig. 2.11) :

$$S = e^{-\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2} \quad (2.24)$$

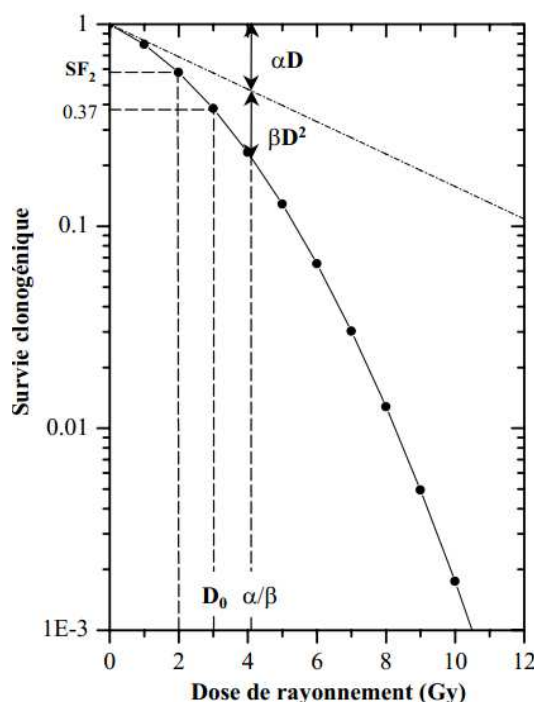


FIGURE 2.11 – Représentation conventionnelle de la survie cellulaire en fonction d'une dose d'irradiation. Les paramètres α et β caractérisent la radiosensibilité de la lignée cellulaire.

L'épaule caractérisant la première partie de la courbe est associé au rapport α/β , qui s'exprime en Gy et qui correspond à la dose pour laquelle les composantes linéaire ($\alpha \cdot D$) et quadratique ($\beta \cdot D^2$), contribuent pour parts égales à la létalité radio-induite. α et β sont des paramètres qui définissent la radiosensibilité de la lignée étudiée. α , qui correspond à la tangente à l'origine, est associé aux lésions létales d'emblée, c'est à dire aux dommages sévères, non réparables. Il dépend de nombreux paramètres comme la pression en oxygène, le pH, la qualité du rayonnement ionisant, le volume nucléaire, la structure de la chromatine, l'intégrité des gènes de réparation et la phase du cycle cellulaire. Le paramètre β décrit quant à lui les lésions sublétales et un effet variant comme le carré de la dose D (observé au plus fortes doses). Si l'on admet que deux cassures chromosomiques créées simultanément, à courte distance ($< 0.1 \mu m$) sur le même chromosome ou sur deux chromosomes adjacents, par deux trajectoires électroniques différentes, sont capables de fusionner, alors la réparation sera infidèle et conduira souvent à la mort de la cellule. La probabilité de fusion dépend du nombre de fragments chromosomiques, *i.e.* du carré de la dose. Cette hypothèse est en bon accord avec les travaux de *Cornforth* qui montrent une proportionnalité entre le logarithme de la létalité radio-induite et le taux d'aberrations chromosomiques dues aux échanges asymétriques

[Corn 87].

Les deux modèles proposés jusqu'à maintenant pour interpréter cet ajustement mathématique ont été invalidés par l'expérience. Le premier modèle fut proposé par *Goodhead* en 1982. Il faisait l'hypothèse que la formation des lésions létales provenait de la succession de lésions sublétales, devenant létales par accumulation sur une cible [Good 82]. Depuis, cette hypothèse a été invalidée puisqu'il a été montré que la probabilité de former une CDB à la suite de CSB, produites le long de deux trajectoires électroniques distinctes est de seulement 10^{-8} . Le deuxième modèle dit "de réparation" fut proposé en 1993. Il fait l'hypothèse que les mécanismes de réparation sont saturables et que l'accumulation des lésions sublétales dans le temps (et non plus sur un site) soit responsable de la létalité radio-induite. Bien que cette hypothèse soit en bon accord avec le modèle LQ et les effets du débit de dose, le concept de saturation des mécanismes de réparation n'a pas été validé par l'expérience [Diko 93].

L'ajustement par la fonction LQ doit donc être utilisé avec prudence. Il s'agit uniquement d'un outil d'analyse statistique à partir duquel on peut extraire des informations des paramètres α et β et comparer les survies après différents traitements, sans pour autant pouvoir expliquer toute la mécanistique qui se cache derrière la mort radio-induite mesurée.

Chapitre 3

Le synchrotron pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs cérébrales

Sommaire

3.1	Rayonnement synchrotron et ligne biomédicale	46
3.1.1	Production du rayonnement synchrotron	46
3.1.2	La ligne biomédicale (ID17)	47
3.2	Tomographie par rayonnement synchrotron	48
3.2.1	Principe de la tomographie X	49
3.2.2	Reconstruction des images par rétroprojection filtrée	50
3.2.3	Les spécificités liées au rayonnement synchrotron	52
3.3	Radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron	54
3.3.1	Principe et origine	54
3.3.2	Évolution vers la radiothérapie synchrotron	57

Le rayonnement synchrotron est utilisé dans de nombreux domaines tels que l'étude de la structure des matériaux, la microscopie, la cristallographie, *etc.* Il est également utilisé dans le domaine médical et plus particulièrement pour l'imagerie et la thérapie des tumeurs cérébrales, thématiques de recherches dominantes sur la ligne biomédicale de l'ESRF. Dans ce travail de thèse, le rayonnement synchrotron a été utilisé pour des études dosimétriques *in vitro*, un essai pré-clinique de traitement des tumeurs cérébrales, des expériences d'imagerie en transmission *in vivo* et d'imagerie par contraste de phase *ex vivo*, ainsi que des expériences de microscopie par fluorescence. Nous allons dédier ce chapitre à une rapide présentation de ce grand instrument et nous décrirons plus précisément les techniques de SRCT (Synchrotron Radiation Computed Tomography) et SSRT (Synchrotron Stereotactic RadioTherapy) les plus largement utilisées dans le cadre de cette thèse.

3.1 Rayonnement synchrotron et ligne biomédicale

3.1.1 Production du rayonnement synchrotron

Le rayonnement synchrotron est un rayonnement électromagnétique émis par des particules chargées lorsqu'elles sont déviées (et donc ralenties) par d'autres particules chargées (noyaux atomiques notamment). Au synchrotron européen (ESRF, acronyme pour *European Synchrotron Radiation Facility*), le rayonnement de photons est émis à partir d'électrons qui sont d'abord accélérés par un accélérateur linéaire de 16 m de long (LINAC) jusqu'à une énergie de 200 MeV. Ils sont ensuite injectés dans un *booster* qui les accélère à nouveau jusqu'à une énergie finale de 6 GeV, puis sont stockés dans un anneau (sous forme de paquets d'électrons) où des cavités radio-fréquences permettent de les ré-accélerer pour maintenir leur énergie. Cet anneau consiste en une cavité sous vide (10^{-9} mbar en présence du faisceau) de 2-3 cm de haut, de 20 cm de large et d'un km de long. Elle n'est pas exactement circulaire mais composée de 32 sections rectilignes et de 64 aimants de courbure (1-2 T) qui modifient la trajectoire des électrons. Des éléments multi polaires permettent de focaliser le faisceau tandis que des éléments d'insertion (dipôles magnétiques alternés appelés onduleurs et *wigglers*) permettent de produire le rayonnement électromagnétique. La figure 3.1 illustre les différentes sections accélératrices et de stockage du synchrotron européen.

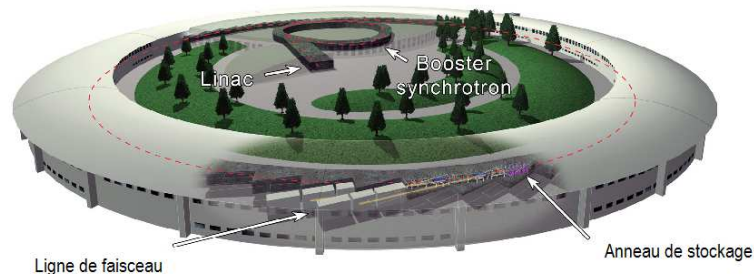


FIGURE 3.1 – Représentation du synchrotron européen situé à Grenoble.

Lorsque les électrons traversent les éléments d'insertion, ils perdent de l'énergie sous forme d'un rayonnement électromagnétique, appelé rayonnement de freinage (ou *Bremsstrahlung*), émis de manière tangentielle à la trajectoire des électrons. Ce rayonnement dépend de l'énergie des électrons, mais couvre une large gamme du spectre électromagnétique (des infrarouges aux rayons γ). A la sortie de l'ondulateur, le faisceau de photons est très focalisé (diamètre d'environ 0.1 mm). Il est ensuite conduit à travers les lignes de lumière, jusqu'aux cabines expérimentales (41 au total à l'ESRF, spécialisées dans différentes applications, de l'étude des matériaux à la microfluorescence en passant par la cristallographie des protéines). Le rayonnement synchrotron possède des caractéristiques particulières : une forte brillance (rayonnement intense et focalisé) et une importante cohérence (spatiale et temporelle). Il est également très stable, polarisé et pulsé.

3.1.2 La ligne biomédicale (ID17)

La ligne biomédicale de l'ESRF (ID17, pour *Insertion Device 17*) est principalement dédiée au développement de nouvelles méthodes d'imagerie médicale (tomographie bi-énergie, tomographie par soustraction au K-edge, angiographie, imagerie par contraste de phase, *etc*) et de radiothérapie pour le traitement des tumeurs cérébrales (radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT) et radiothérapie par microfaisceaux (MRT)). Le rayonnement synchrotron produit sur cette ligne de lumière possède plusieurs spécificités essentielles au développement de ces techniques. Les principales sont sa forte brillance (de l'ordre de 10^{14} $ph/s/0.1\%/mrad$) et le domaine énergétique exploitable (25 - 150 keV). En effet, le rayonnement électromagnétique produit sur ID17 est 5 ordres de grandeurs plus intense que celui d'un générateur de rayons X classique (cf. Fig 3.2). Cela permet de sélectionner une bande passante énergétique très fine ($\Delta E/E = 10^{-3}$) tout en conservant un faisceau de rayons X très intense (de l'ordre de 10^{12} $ph/s/cm^2$). D'autre part, contrairement aux spectres classiques obtenus par un accélérateur linéaire conventionnel (entre 6 et 20 MV), le domaine énergétique exploitable sur la ligne de lumière ID17 de l'ESRF est compris entre 25 et 150 keV . Les processus d'interactions majoritaires ne sont pas les mêmes à ces énergies, comme nous l'avons vu dans la partie précédente (cf. paragraphe 2.1, page 26). Enfin, la forte cohérence spatiale et temporelle du faisceau permet d'envisager son utilisation pour l'imagerie par contraste de phase.

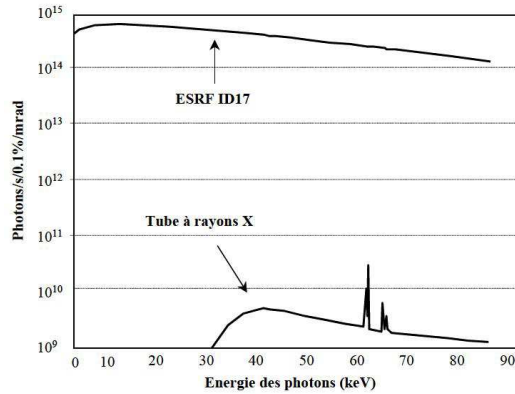


FIGURE 3.2 – Comparaison des brillances en énergie du faisceau issu de la source ID17 (à 200 mA - Wiggler : 1.4 T - 1.6 m à 150 mm /source) et d'un tube à rayons X classique (110 kV - 2.5 mm Al à 1 m /source). La brillance correspond à la densité photonique par unité d'angle solide et par 0.1% de bande passante.

La ligne de lumière ID17 se décompose en deux cabines expérimentales qui ne peuvent pas fonctionner simultanément, puisqu'elles utilisent le même faisceau. Une première, située 37 m après la source, est dédiée aux expériences de MRT. Le faisceau y est très intense et de petites dimensions ($H \times V = 74.1 \times 3.7$ mm). Une seconde, distante de 151 m par rapport à la source, est dédiée aux expériences de SSRT et de tomographie. La dispersion des photons permet d'utiliser un faisceau large (jusqu'à 15 cm de large, sur 1.4 cm de haut), nécessaire aux applications médicales de la ligne. L'ensemble des expériences réalisées dans cette thèse a été conduit dans cette deuxième cabine expérimentale. La figure 3.3 représente l'organisation de la ligne de lumière ID17.

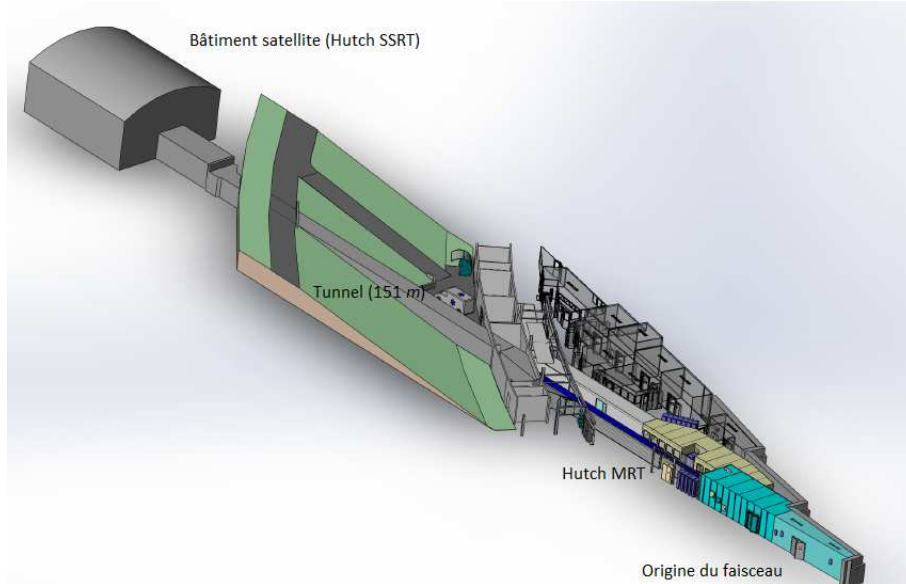


FIGURE 3.3 – Ligne de lumière ID17 : La ligne est composée de deux cabines expérimentales, celle de MRT et celle de SSRT. Du fait de l'importante distance entre la source et la cabine SSRT (151 m), le faisceau disponible dans cette cabine expérimentale y est large (jusqu'à 15 cm).

Deux monochromateurs sont disponibles au niveau de la cabine SSRT pour sélectionner une bande passante énergétique fine. Un monochromateur dit d'angiographie et un second dit de tomographie. Le premier permet de sélectionner deux faisceaux de 150 eV de bande passante et d'énergie moyenne séparées de 300 eV. Il a été utilisé pour les expériences de tomographie à deux énergies (cf. partie 13.2, p.213). Le second permet de sélectionner un faisceau de quelques dizaines d'eV de bande passante ($\Delta E/E = 10^{-3}$) entre 25 et 150 keV. Il a quant à lui été utilisé pour les expériences de tomographie classique et d'irradiation (cellules et animaux). La figure 3.4 illustre le passage du faisceau à travers ces deux monochromateurs. Deux détecteurs de rayons X peuvent également être alignés avec le faisceau pour les expériences d'imagerie (un détecteur à semi-conducteur au Germanium et une caméra CCD (Frelon)). La rotation nécessaire à la tomographie est assurée par un support motorisé sur lequel les échantillons sont fixés.

3.2 Tomographie par rayonnement synchrotron

La tomographie par rayons X s'est développée dans les années 70 et a été marquée par l'apparition du premier tomodensitomètre (ou scanner) en 1972. Cette technique, inventée par *Godfrey Hounsfield*, a depuis ses débuts, connue de nombreuses améliorations qui permettent aujourd'hui d'imager l'anatomie en coupes, à des résolutions sub-micrométriques et en quelques secondes seulement. Dans cette partie nous commencerons par expliquer les principes sur lesquels repose la tomographie X, puis nous expliquerons les spécificités liées à la tomographie par rayonnement

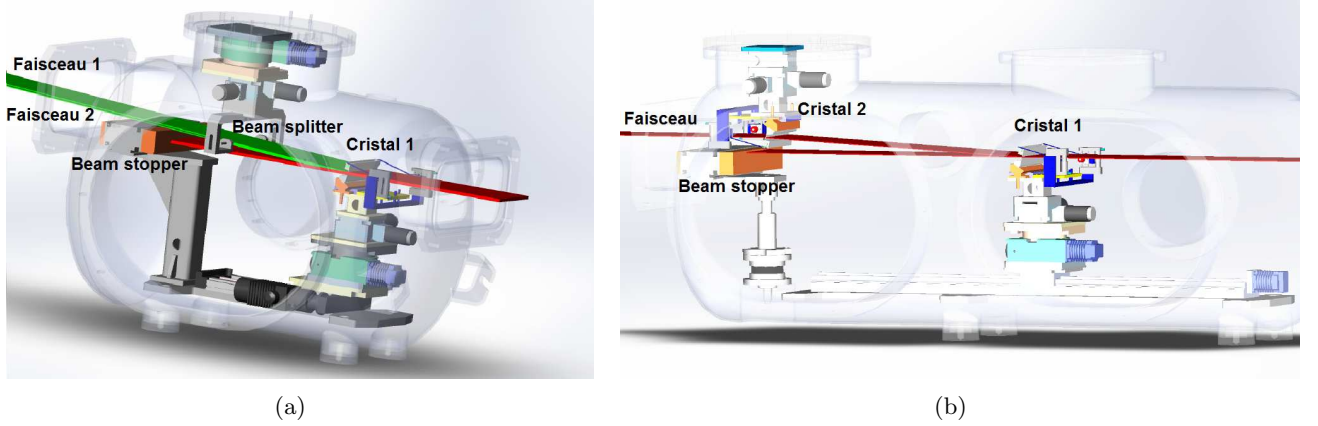


FIGURE 3.4 – (a) Schéma du monochromateur d'angiographie et (b) du monochromateur de tomographie.

synchrotron (ou SRCT pour Synchrotron Radiation Computed Tomography).

3.2.1 Principe de la tomographie X

La tomographie X repose sur la détection d'un rayonnement ayant traversé le patient. Si on néglige le rayonnement diffusé, la fluence de particules mesurée à la sortie de l'objet s'exprime en fonction des coefficients d'atténuation linéiques des différents matériaux composant l'objet (μ_i , en cm^{-1}), de l'épaisseur de chaque matériau (z_i , en cm) et de la fluence initiale (Φ_0 , en $\text{particules}/\text{cm}^2/\text{s}$), ou plus précisément, la fluence qui serait détectée sans la présence de l'objet.

$$\Phi(x, y) = \Phi_0 \cdot e^{-\mu_1 z_1(x, y) - \mu_2 z_2(x, y) - \mu_3 z_3(x, y) \dots} \quad (3.1)$$

Cette mesure tient compte de la somme des atténuations des différents tissus présents dans la trajectoire du faisceau. Une unique projection ne permet pas d'extraire une information volumique mais seulement de mettre en évidence les contours des tissus fortement contrastés. L'acquisition de nombreuses projections sous différents angles autour de l'objet permet, à l'inverse, de construire une coupe tomographique.

Le scanner conventionnel actuellement utilisé en clinique est composé d'un tube à rayons X associé à un détecteur mono ou multi-barrettes, qui sont tous deux face à face et montés sur un axe rotatif pour tourner autour du patient. La géométrie du faisceau correspond à un éventail de faible épaisseur. Son spectre énergétique polychromatique est souvent de l'ordre de 100 keV . Cependant, la distribution énergétique est ajustable grâce au réglage de la tension accélératrice des électrons du tube à rayons X . L'intensité du rayonnement se contrôle quant à elle avec l'intensité appliquée entre les électrodes du tube. Le détecteur couvre un arc de cercle assez grand (de l'ordre de 50°) afin de pouvoir imager des volumes à tailles humaines. La dose délivrée pour un tel examen dépend de l'organe imagé et plus particulièrement de sa densité électronique et de sa taille. Par exemple, un scan des poumons (environ 20 mGy délivrés aux organes du thorax) est moins irradiant qu'un scan du cerveau (environ 70 mGy au cerveau). L'ajustement du spectre énergétique et de l'intensité en fonction de l'examen permet de réduire cette dose au cas par cas.

3.2.2 Reconstruction des images par rétroprojection filtrée

Les projections acquises aux différents angles autour du patient sont empilées pour construire un sinogramme. Si l'objet est centré par rapport à l'axe de rotation, le signal présenté sur le sinogramme suivra une droite verticale. Si l'objet est décalé, le signal correspondra à une sinusoïdale dont l'amplitude dépend de l'importance du décalage. La figure 3.5 illustre le principe de construction d'un sinogramme. Plus le nombre de projections est important, plus le signal est précis.

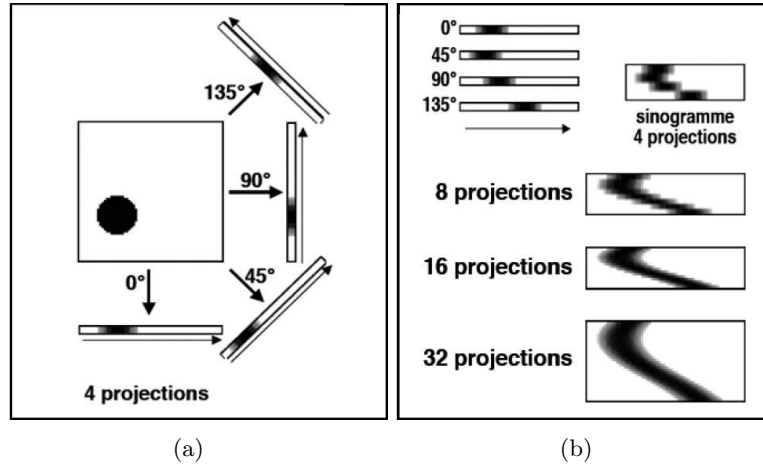


FIGURE 3.5 – (a) Acquisition des projections d'un objet et (b) construction du sinogramme correspondant [Inst 08].

La manière la plus simple de construire une coupe tomographique à partir du sinogramme consiste à épandre (ou rétroprojeter) les valeurs des projections sur la portion de plan (x, y) correspondante. Chaque projection $p(u, \theta)$ est une fonction de u et de θ , où $u = x.\cos(\theta) + y.\sin(\theta)$ et θ est l'angle de la projection. L'image peut être reconstruite en sommant l'intégralité des projections (acquises entre 0 et π). Cette méthode présente l'inconvénient d'introduire d'importants artefacts en étoile dans l'image (d'autant plus important que le nombre de projections est faible) et de déformer les structures, comme on peut le voir sur la figure 3.6.

La méthode de reconstruction des images par rétroprojection filtrée devient nécessaire pour s'affranchir de ces artefacts. Cette méthode nécessite le calcul de la transformée de Fourier (TF) de l'image, qui décompose chaque projection en une somme de fonctions sinusoïdales. La TF ($F(\nu)$) d'une projection unidirectionnelle $f(x)$ vaut :

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x).e^{-2i\pi\nu x} dx \quad (3.2)$$

Avec ν une variable, appelée fréquence spatiale (m^{-1}), qui définit la fréquence du signal dans l'espace de Fourier. Cette fréquence a pour valeur maximum $1/2\Delta x$, où Δx est le pas de numérisation. La fréquence maximum est appelée fréquence de Nyquist. La TF bidimensionnelle de l'image se

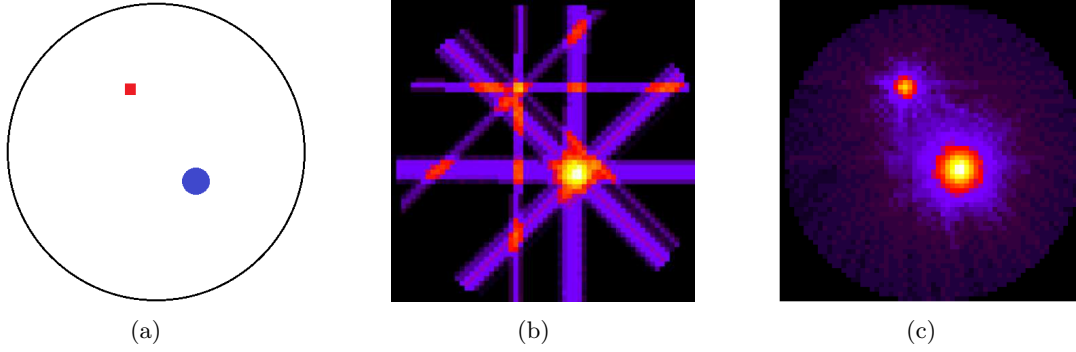


FIGURE 3.6 – (a) Représentation schématique de l’objet imagé. Reconstruction de l’image par rétroprojection simple à partir de (b) 4 ou (c) de l’ensemble des projections [Dubois 98].

calculé en appliquant une transformée de Fourier sur chaque ligne de l’image, puis une seconde TF, sur chaque colonne.

$$F(\nu_x, \nu_y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \left[\int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \cdot e^{-2i\pi(\nu_x \cdot x + \nu_y \cdot y)} dx \right] dy \quad (3.3)$$

L’image complexe résultante est symétrique par rapport à l’origine. La figure 3.7(a) représente l’image complexe de l’objet présenté plus haut (voir la figure 3.6(a)). Le point à l’origine représente le signal moyen des pixels. C’est une composante continue. Autour de l’origine, on observe les composantes de basses fréquences qui portent l’information de la structure générale de l’image. Dans la partie centrale se trouvent les composantes de moyennes fréquences qui indiquent des variations rapides entre les pixels et portent une information de détails très importante pour la fidélité de l’image. Enfin, en périphérie, se trouvent les composantes de hautes fréquences qui constituent le bruit statistique de l’image. La rétroprojection filtrée consiste à appliquer un filtre Rampe puis un filtre lissant à l’image complexe (cf. Fig. 3.7(b)). Le filtre Rampe permet de mettre à 0 la composante continue de l’image et amplifie les hautes fréquences. Cela permet d’éliminer les artefacts en étoile. Ce filtre a le gros inconvénient d’introduire un bruit important dans l’image qui peut être réduit par un filtre lissant, de type passe-bas, qui élimine les composantes de hautes fréquences. Le filtre de Hann est un des plus connus pour cette application, mais d’autres existent également (Butterworth, Hamming, Parzen, *etc*). Le produit de ces deux filtres est représenté sur la figure 3.7(b).

La TF inverse de l’image filtrée est réalisée et les projections filtrées sont rétroprojetées pour construire l’image tomographique. La figure 3.8 présente les résultats, sans et avec l’application du filtre de Hann.

L’information contenue dans les pixels d’une image tomographique est directement liée au coefficient d’atténuation linéique du matériau. Ces coefficients sont généralement transformés en nombres CT (NCT, exprimés en unité Hounsfield (HU)) pour disposer d’une grandeur plus facilement interprétable.

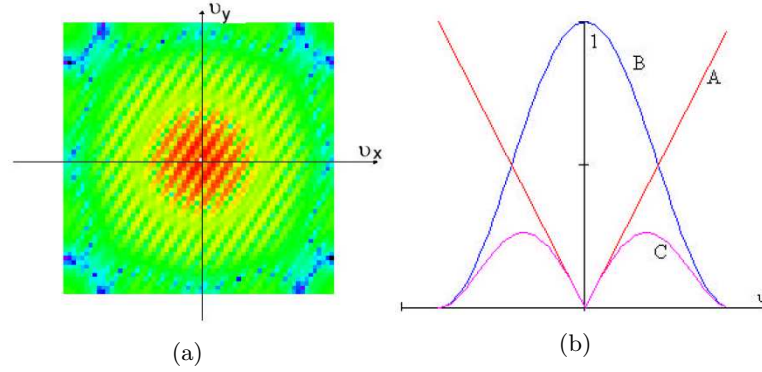


FIGURE 3.7 – (a) Représentation de l'image 3.6(c) dans l'espace de Fourier. (b) Produit (C) des filtres Rampe (A) et de Hann (B) [Dubo 98].

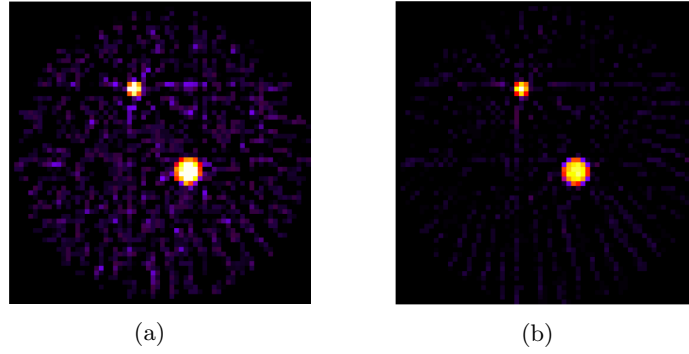


FIGURE 3.8 – (a) Image reconstruite par rétrojection filtrée sans application du filtre de Hann lissant et (b) avec l'application du filtre de Hann [Dubo 98].

$$NCT = 1000 \times \frac{\mu_{tissu} - \mu_{eau}}{\mu_{eau}} \quad (3.4)$$

Le contraste dans les images dépend donc du rapport μ_{tissu}/μ_{eau} qui est représenté en fonction de l'énergie incidente, pour différents tissus, sur la figure 3.9. Il est très proche de 1 pour les tissus mous, quelque soit l'énergie entre 20 et 100 keV. Il est inférieur à 1 pour les tissus graisseux entre 20 et 50 keV et largement plus grand que 1 pour les tissus osseux quelque soit l'énergie.

3.2.3 Les spécificités liées au rayonnement synchrotron

Du fait du flux de photons important disponible sur la ligne médicale de l'ESRF, un rayonnement quasi-monochromatique peut être sélectionné par un cristal monochromateur tout en conservant un flux intense (de l'ordre de $10^{12} \text{ ph/s/cm}^2$). A l'inverse d'un scanner conventionnel, cette source de rayonnement est immobile et une utilisation pour la tomographie nécessite la rotation de l'objet. Le schéma 3.10 représente la cabine expérimentale. La distance monochromateur-patient vaut 7

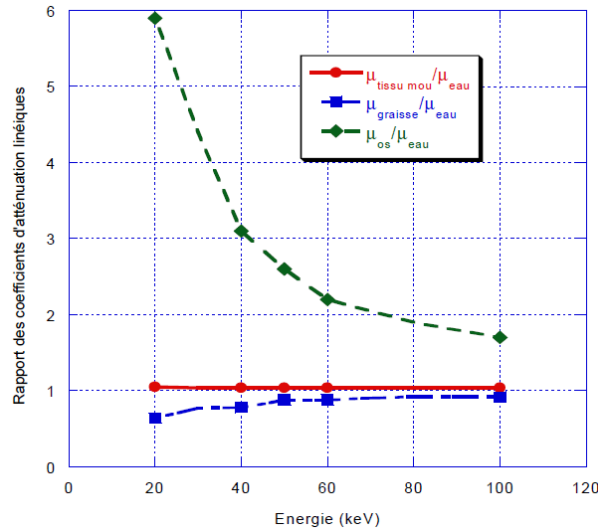


FIGURE 3.9 – Coefficients d’atténuation relatifs à l’eau pour les tissus mous, gras et osseux en fonction de l’énergie des *RX* entre 20 et 100 *keV* [Inst 08].

m , et la distance patient-détecteur, 6 m . Le détecteur est fixe également, et aligné par rapport au faisceau.

A l’entrée de la cabine expérimentale, le faisceau peut mesurer jusqu’à 15 *cm* de large sur 1.4 *cm* de haut. Les expériences qui nécessitent l’utilisation d’un faisceau homogène ne peuvent pas exploiter l’intégralité de ce rayonnement, mais une région centrale d’environ 7 à 10 *cm* de large, où le profil est plat. L’échantillon balaye le faisceau de haut en bas pour l’acquisition de gros volumes.

L’acquisition des données et la reconstruction des images sont similaires à celles décrites précédemment (cf. paragraphe 3.2.1, page 49). Différentes projections sont acquises autour de l’objet. Les coupes sont reconstruites par rétroprojection filtrée. L’information reconstruite n’est pas convertie en NCT, mais est directement égale aux coefficients d’atténuation linéiques du matériau représenté dans chaque pixel. Les spécificités du rayonnement synchrotron permettent de s’affranchir de deux sources d’artéfacts importantes :

- **Les artéfacts de durcissement de faisceau** sont inévitables en CT conventionnelle, car les faisceaux polychromatiques ne sont pas atténués de manière homogène dans la matière. Les composantes de basses énergies sont plus fortement atténuées que celles de hautes énergies, ce qui entraîne une réduction des NCT au centre des images (zone où l’atténuation est la plus forte), d’autant plus forte que la matière est absorbante (os, métaux...). Des corrections post-acquisitions permettent de corriger partiellement ces effets. Un rayonnement monochromatique permet de s’affranchir de ce problème.
- **Les artéfacts liés au rayonnement diffusé** entraînent l’apparition de rayures ou d’ombres dans les images CT conventionnelles, suite à une mauvaise interprétation des profils. Dans le cas de la SRCT, le détecteur étant placé à 6 *m* de l’échantillon, la proportion de rayonnement diffusé (émis dans toutes les directions de l’espace) qui l’atteint est faible par rapport aux

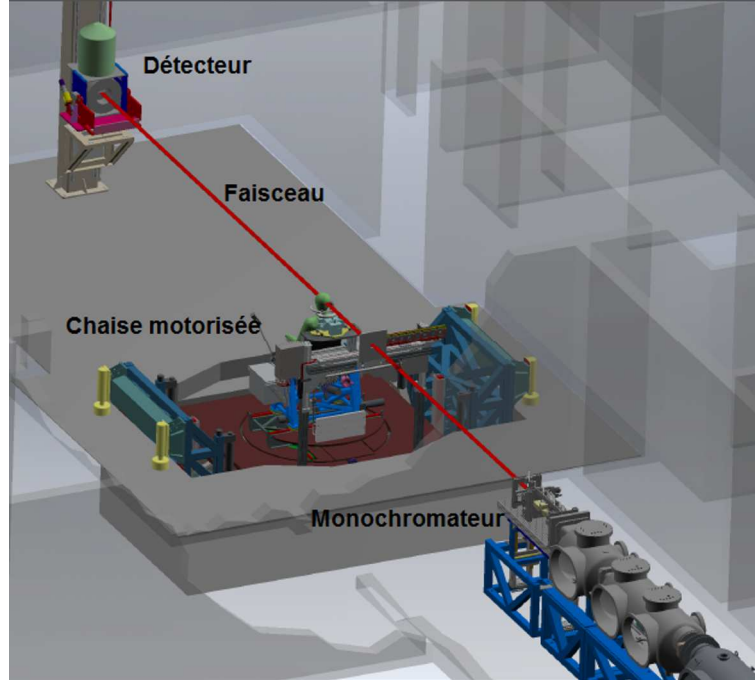


FIGURE 3.10 – Set-up expérimental pour la SRCT. Le faisceau blanc tape sur un cristal monochromateur qui sélectionne une énergie précise ($\Delta E/E = 10^{-3}$). Le patient/échantillon est positionné sur un support motorisé afin d’assurer la rotation et la translation verticale nécessaires à l’acquisition d’un volume. Le détecteur est fixe et aligné avec le faisceau.

rayonnement directement transmis (la dispersion des rayons évolue comme $1/r^2$).

D’autre part, le caractère monochromatique peut-être exploité pour mesurer les fractions massiques des éléments composant un mélange. Nous reviendrons sur cette méthode dans la dernière partie de ce manuscrit (cf. [IV](#), 175).

3.3 Radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron

3.3.1 Principe et origine

La SSRT, acronyme pour *Stereotaxic Synchrotron Radiation Therapy*, est une technique de radiothérapie qui consiste à charger la tumeur en éléments lourds (qu’ils soient sous la forme d’un agent de contraste ou de micro/nanoparticules) avant une radiothérapie à basse énergie (de l’ordre de la dizaine de keV). Nous l’avons vu dans la section [2.1](#), la probabilité d’interaction des photons de basse énergie est plus importante avec les atomes lourds (par effet photoélectrique essentiellement) qu’avec les tissus composés d’atomes légers. Cela crée un différentiel en terme de dépôt d’énergie entre les tissus sains et la tumeur et par conséquent, un taux de dommages radio-induits plus important dans celle-ci. Pour que cette technique soit efficace, plusieurs conditions sont nécessaires :

- La quantité d’atomes lourds administrés dans la tumeur au moment de l’irradiation doit être

suffisante.

- Le recouvrement de la tumeur par les atomes lourds doit être maximal.
- L'énergie d'irradiation doit être optimisée pour maximiser le différentiel de dose tout en respectant les limites de tolérance des organes environnants [Edou 10].

Le principe de cette technique de radiothérapie est apparu dans les années 80, suite à la découverte de l'augmentation des dommages radio-induits dans les lymphocytes de patients ayant effectué une angiocardioraphie. Cette examen consiste à imager la vascularisation à l'aide d'une injection d'agent de contraste iodé dans la circulation sanguine. L'iode, de numéro atomique supérieur à celui des tissus ($Z_I = 53$), rend les vaisseaux visibles aux rayons X grâce à sa plus forte absorption. Callisen et ses collaborateurs ont mesuré la survie des lymphocytes à la suite d'un tel examen. Ils ont montré qu'elle diminuait d'un facteur qui dépend de la concentration en iode et de l'énergie utilisée, par rapport à l'irradiation sans iode. La diminution de la survie cellulaire est fortement corrélée au facteur d'augmentation de dose (ou DEF pour *Dose Enhancement Factor*) qui correspond au rapport des doses déposées dans le milieu contenant l'iode et dans un milieu vierge [Call 79].

$$DEF = \frac{D_{sol}}{D_{eau}} \quad (3.5)$$

Avec D , la dose (Gy) déposée dans le volume d'intérêt :

$$D = \frac{\mu_{en}}{\rho} \times \phi \times E \times 1000 \quad (3.6)$$

où, (μ_{en}/ρ) est le coefficient d'absorption massique ($cm^2.g^{-1}$), ϕ est le flux surfacique de photons incidents (ph/cm^2) et E , leur énergie (J). Le coefficient massique d'une solution $((\mu_{en}/\rho)_{sol})$ s'exprime en fonction des coefficients massiques de chaque élément i et de leurs fractions massiques w_i :

$$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{sol} = \sum_{i=1}^n w_i \cdot \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_i \quad (3.7)$$

Pour un mélange d'eau et d'iode, si l'on connaît la fraction massique w d'iode, on en déduit que :

$$DEF \simeq \frac{(\mu_{en}/\rho)_{iode}}{(\mu_{en}/\rho)_{eau}} \cdot (w + 1) \quad (3.8)$$

Rapidement après, Mello et ses collaborateurs confirment ces résultats. Ils montrent que le taux de micronoyaux ainsi que le taux d'aberrations chromosomiques formés dans les lymphocytes exposés, augmentent d'un facteur 2 à 3 par rapport à une irradiation sans iode. L'effet est fortement dépendant de l'énergie des photons puisqu'une irradiation effectuée à l'aide d'une source de Cobalt 60 ($E_\gamma = 1.25MeV$) n'augmente pas la fréquence des dommages par rapport à l'irradiation contrôle [Sant 83]. Cette augmentation de l'efficacité biologique, qu'elle soit mesurée *via* la détection des micronoyaux, les aberrations chromosomiques ou encore la survie cellulaire, peut être quantifiée par un facteur d'augmentation de sensibilité qu'on appelle communément le *SER*, pour *Sensitive Enhancement Ratio*. Pour la survie cellulaire par exemple, il est défini comme le rapport des survies des cellules irradiées en l'absence (S_ϕ) et en présence de l'élément lourd (S_{High-Z}) :

$$SER = \frac{S_\phi}{S_{High-Z}} \quad (3.9)$$

Cette quantité, sans unité, peut-être qualitativement comparée à l'augmentation de dose physique (DEF), mais les deux rapports ne sont pas nécessairement corrélés puisque la réponse biologique

dépend de nombreux paramètres (phase du cycle, expression de certaines protéines, capacités de réparation, *etc*), autres que l'augmentation de la dose physique.

Mello et ses collaborateurs proposent pour la première fois d'utiliser cet effet, à la base délétère, pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie dans le cas de tumeurs cérébrales. La figure 3.11 représente les rendements en profondeur tracés dans un fantôme de tête humaine portant une tumeur chargée en iode (0,40 g %, concentration mesurée chez l'homme à la suite d'une injection *i.v.* de 70g/70kg), pour une irradiation γ (1.25 MeV) et pour des rayons X (60 keV).

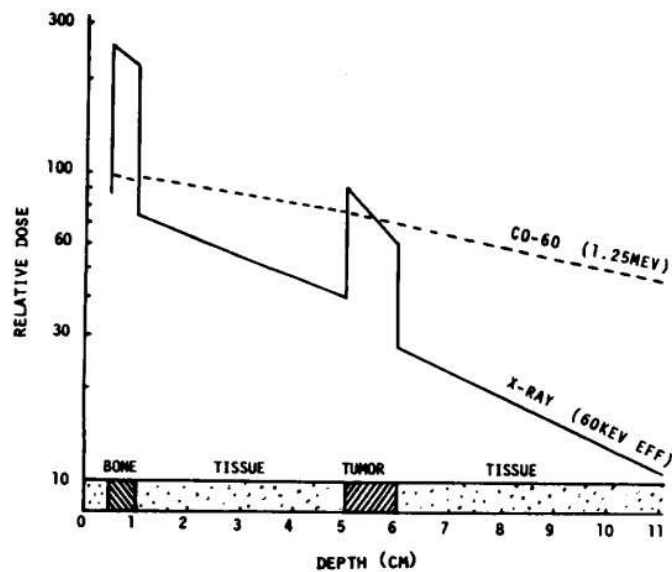


FIGURE 3.11 – Rendements en profondeur calculés dans un fantôme de tête humaine dans laquelle se trouve une tumeur chargée en iode (0,40 g %), pour une irradiation γ d'énergie 1.25 MeV (pointillés) et des rayons X d'énergie 60 keV (trait plein) [Sant 83].

A doses égales dans la tumeur, l'irradiation de basse énergie permet de fortement diminuer la dose aux tissus sains. La principale limitation concerne la dose déposée dans l'os qui atténue fortement les *RX* de basse énergie. Cette dose peut être réduite en multipliant le nombre d'incidences des faisceaux et en les croisant au niveau de la tumeur. L'utilisation d'un rayonnement monochromatique permet également de limiter cette dose qui est principalement due aux composantes de très basses énergies (≤ 10 keV).

Plusieurs études ont ensuite montré la faisabilité de la technique *in vivo*, en associant une prise de contraste iodée à une irradiation réalisée à l'aide d'un scanner dont le spectre énergétique se situe autour de 100 keV [Norm 91] [Mesa 99] [Rose 99]. Dans le cas des tumeurs qui n'accumulent pas facilement l'iode (faible vascularisation ou BHE peu perméable), les auteurs suggèrent l'utilisation d'injections directes. Ainsi, ils observent 80% de régression totale de la croissance tumorale chez la souris porteuse d'un modèle sous cutané de carcinome. Sans l'injection d'iode préalable à l'irradiation, les résultats ne montrent aucune régression totale et une régression partielle chez

seulement 10% des animaux [Sant 83].

Les débuts de la technique apparaissent satisfaisants et encourageants. Un essai clinique a été conduit avec un scanner conventionnel sur des patients porteurs de petites métastases cérébrales et ayant reçu une injection intraveineuse d'iode (sous la forme d'agent de contraste) [Rose 99]. L'absence d'intolérance et la disparition des métastases chez certains patients justifient les efforts pour optimiser la technique dans le cas des tumeurs cérébrales où la principale limitation de la radiothérapie reste la tolérance des tissus cérébraux sains.

3.3.2 Évolution vers la radiothérapie synchrotron

Le scanner est un outil développé pour l'imagerie médicale. Son faible flux de rayons X et son spectre énergétique polychromatique limitent fortement son utilisation pour la radiothérapie. Le rayonnement produit par un synchrotron est suffisamment intense pour pouvoir sélectionner une fine bande passante en énergie et récupérer un faisceau de rayons X quasi monochromatique ($\Delta E/E = 10^{-3}$) présentant un flux important (de l'ordre du Gy/min , avec des variations selon le mode de fonctionnement de la machine) (cf. section 3.1.1, p.46). Ces caractéristiques permettent à la technique d'évoluer et donnent naissance à la SSRT qui se développe à partir des années 2000 sur la ligne biomédicale ID17 de l'ESRF. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées dans le but de comprendre les mécanismes physiques et radiobiologiques de la SSRT, afin d'améliorer son efficacité. Nous allons dresser un rapide bilan des principaux résultats obtenus et qui justifient aujourd'hui le commencement d'essais cliniques de phases I et II chez l'homme.

Les agents de contraste (AC) iodés présentent l'avantage d'être couramment utilisés en clinique pour de nombreux examens d'imagerie. Une injection intraveineuse d'Ioméron[®] jusqu'à des concentrations en iode très élevées (350 mg/ml) est très bien tolérée par l'homme ou l'animal et s'accumule dans une tumeur cérébrale à une concentration de l'ordre du mg/ml ($1.2 \pm 1.0 mg/mL$ chez le rat porteur d'un gliome [Adam 06]). Les premières études ont donc été réalisées avec cet élément qui reste extracellulaire [Loru 94]. Le tableau 3.1 regroupe les principaux résultats.

Les résultats liés à l'utilisation de l'iode (sous forme d'Ioméron[®] ou d'IUdR¹) indiquent différentes choses :

- L'ajout d'iode sous forme d'agent de contraste, en combinaison à une irradiation X de basse énergie, augmente la dose déposée dans la tumeur [Boud 05] et contribue de manière significative à l'augmentation de la survie de rats porteurs de gliomes. L'espérance de vie des animaux est augmentée de 20 et de 44% pour les rats ayant reçu une radiothérapie sans et avec l'injection d'iode, par rapport aux animaux non traités [Adam 03].
- Des simulations Monte Carlo montrent que l'association de 10 mg/ml d'iode dans la tumeur et d'une énergie de 50 keV est idéale pour maximiser le différentiel de doses déposées dans les tissus sains et les tissus tumoraux, tout en respectant la dose de tolérance de l'os [Boud 05].
- *In vivo*, chez le rongeur porteur d'un gliome F98, aucune guérison complète n'est observée dans les conditions étudiées et la principale limitation semble provenir de la quantité d'iode trop faible accumulée dans la tumeur ($1.2 \pm 1.0 mg/mL$ pour une injection d'Ioméron[®] seule,

1. L'IUdR, ou Iododeoxyuridine est un composé iodé, analogue de la thymidine, qui s'incorpore dans l'ADN pendant la réplication cellulaire.

Etude	Adam 2003 [Adam 03]	Corde 2004 [Cord 04]	Boudou 2005 [Boud 05]	Adam 2006 [Adam 06]
Type	<i>In vivo</i> Survie rat gliome F98	<i>In vitro</i> Survie clono- génique (cell. SQ20B)	Dosimétrie MC Fantôme tête + tumeur	<i>In vivo</i> Survie rat gliome F98
Irradiation	<i>RX</i> 60 keV 15 Gy - 1 fraction	<i>RX</i> 32.8 keV, 33.5 keV, 50 keV et 70 keV	<i>RX</i> mono ou polychromatiques ≠ énergies	<i>RX</i> 50 keV 5, 15 et 25 Gy
Iode ($Z = 53$)	Ioméron [®] (AC) injection <i>i.v</i>	Ioméron [®] (AC) ou IUdR	Iode distribution homogène	Ioméron [®] (AC) + Mannitol [®] <i>i.v</i> et <i>i.c</i>
Radiotoxicité	Oui	Oui	Oui	Oui
Dépendance à l'énergie	-	Oui	Oui	-

TABLE 3.1 – Récapitulatif des différents résultats obtenus sur la photoactivation de l'iode, à l'ESRF.

- par voie veineuse [Adam 06], ce qui correspond à un DEF de 1.2).
- L'utilisation de Mannitol[®]² et la voie d'injection intra-carotidienne (*i.c*) (plutôt qu'intra-veineuse (*i.v*)) sont deux paramètres qui augmentent l'accumulation de l'AC dans la tumeur : Une injection *i.v* d'Ioméron[®] et de Mannitol[®] permet d'accumuler 20.5 ± 1.0 mg/mL d'iode dans la tumeur. Une injection *i.c* d'Ioméron[®] seul permet d'accumuler 4.1 ± 1.2 mg/mL d'iode. Et une injection *i.v* d'Ioméron[®] seul permet d'accumuler 1.2 ± 1.0 mg/mL d'iode. Ces techniques sont par contre plus invasives et le Mannitol[®] n'est pas bien toléré par les animaux.
 - L'iode utilisé sous la forme d'IUdR présente un effet intéressant *in vitro*. Les électrons Auger produits aux sites d'interactions ont un faible parcours dans l'eau (quelques nanomètres) et augmentent de manière importante la complexité des dommages radio-induits, du fait de leur localisation intra-nucléaire [Cord 04].

Ces différents résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et d'orienter les études dans d'autres directions, comme l'injection par voie directe, pour augmenter la concentration en atomes lourds sans utiliser de produits toxiques comme peut l'être le Mannitol[®], ou l'utilisation d'agents aux propriétés radiosensibilisantes plus importantes. Les composés Platine par exemple (cisplatine, carboplatine), déjà très utilisés dans le traitement de différents cancers (ovaires, testicules, etc), présentent le double intérêt de porter un atome lourd ($Z_{Pt} = 78$) en plus de posséder des propriétés anti-tumorales [Khok 85]. Le tableau 3.2 présentent les principales études réalisées à l'ESRF sur cet élément.

2. Le Mannitol[®] est un agent qui perméabilise de la BHE.

Etude	Biston 2004 [Bist 04]	Biston 2004 [Bist 04]	Rousseau 2007 [Rous 07b]	Bobyk 2012 [Boby 12]
Type	<i>In vivo</i> Survie rat gliome F98	<i>In vitro</i> cell. F98 CDB	<i>In vivo</i> Survie rat gliome F98	<i>In vivo</i> Survie rat gliome F98
Irradiation	<i>RX</i> 78.0 et 78.8 <i>keV</i> 1 fraction 15 <i>Gy</i>	<i>RX</i> 30, 40 78.0, 78.8 et 85 <i>keV</i> 70 <i>keV</i> 1 fraction 15 <i>Gy</i>	<i>RX</i> 80 <i>keV</i> γ 6 <i>MV</i> 3 fractions 24 <i>Gy</i>	<i>RX</i> 78.8 <i>keV</i> γ 6 <i>MV</i> 1 fraction 15 <i>Gy</i>
Platine ($Z = 78$)	Cisplatine 1 injection directe	Cisplatine incubation 6h	Carboplatine CED	Carboplatine Pompe osmotique (6j)
Radiotoxicité	Oui	Oui	Oui	Oui
Dépendance à l'énergie	Non	Oui	Non	Non

TABLE 3.2 – Récapitulatif des différents résultats obtenus sur la photoactivation du Platine, à l'ESRF.

Les résultats *in vivo* portant sur le cisplatine et le carboplatine sont en bon accord pour affirmer que leur combinaison à une radiothérapie externe est très efficace pour le traitement des tumeurs cérébrales chez le rat. Les auteurs n'observent cependant pas de dépendance de la réponse tumorale à l'énergie, indiquant que l'effet n'est pas attribué à la photoactivation des atomes de platine mais plutôt à un effet de chimio/radiosensibilisation [Rous 07b] [Boby 12]. Cependant, il est important de noter que ces résultats sont aujourd'hui, les meilleurs jamais obtenus avec ce modèle tumoral. L'étude de Rousseau *et al.* montre qu'une injection directe par la méthode de CED (cf. paragraphe 1.2.6, p.13) de 6 μg / 20 μL de cisplatine chez le rat porteur d'un gliome F98 augmente la survie moyenne des animaux à 59 ± 13 j, contre 24 ± 1 j pour les animaux non traités. L'association de cette injection à une irradiation de 15 *Gy* (1 fraction) à 6 *MV* ou 78.8 *keV*, augmente l'efficacité thérapeutique, conduisant à une moyenne de survie de 75 ± 18 j et 74 ± 19 j respectivement, avec 17 et 18% de survivants à long terme dans chaque cas.

In vitro, une augmentation spécifique des CDB est mesurée pour une irradiation réalisée à 78.8 *keV* (au dessus du K-edge du Platine), par rapport à une irradiation réalisée en dessous du K-edge du Platine (78.0 *keV*). Le taux de CDB, exprimé comme le rapport des fragments d'ADN ayant migré hors du gel avec et sans Cisplatine, atteint $29 \pm 3\%$ au dessus du K-edge contre $17 \pm 5\%$ en dessous du K-edge du platine. Cette dépendance énergétique peut raisonnablement s'expliquer par la plus forte concentration de platine utilisée dans cette expérience (6h d'exposition à 30 μM de cisplatine) et à la forte dose délivrée aux cellules (30 *Gy* en une fraction) qui permettent de produire une augmentation importante du dépôt d'énergie [Bist 04]. La toxicité de l'exposition au cisplatine

seule n'est cependant pas mentionnée.

Les différentes études conduites *in vitro* et *in vivo* permettent aujourd'hui de mieux comprendre les mécanismes de la radiothérapie renforcée par éléments lourds. Les résultats associés à l'IUdR semblent indiquer que la proximité des atomes lourds à l'ADN est un critère important pour augmenter l'efficacité biologique du traitement. Cependant, la cytotoxicité des composés disponibles reste un facteur très limitant pour leur utilisation *in vivo*. Les agents de contraste sont quant à eux plus faciles d'utilisation puisqu'ils sont déjà approuvés pour une utilisation clinique à des concentrations en atomes lourds élevées. Leur efficacité pour la radiothérapie renforcée par éléments lourds est cependant limitée par leur faible accumulation dans la tumeur et leur localisation extracellulaire qui ne maximise pas l'efficacité biologique du dépôt de dose.

Aujourd'hui, la SSRT fait l'objet d'un essai clinique de phase I et II chez l'homme. L'étude concerne le traitement de petites métastases cérébrales. Une injection d'iode (AC, sous forme d'Ioméron[®]) intra-veineuse est réalisée en amont de la radiothérapie synchrotron, réalisée avec un faisceau de 80 keV. Une seule fraction est pour le moment délivrée au synchrotron, le reste de la thérapie étant assurée par le CHU de Grenoble dans le cadre d'un traitement conventionnel. Le premier but de l'essai clinique est de montrer la faisabilité de la technique. Depuis le début de l'essai (en juin 2012), quatre patients ont bénéficié du traitement.

En parallèle de cet essai clinique, des efforts de recherche pré-clinique sont menés dans l'équipe afin de trouver des solutions pour augmenter l'efficacité thérapeutique de la radiothérapie synchrotron. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui a pour principal objectif l'évaluation du potentiel thérapeutique des nanoparticules métalliques. Les études publiées sur ce sujet depuis quelques années, semblent indiquer un fort potentiel des nanoparticules pour la radiosensibilisation tumorale. Le chapitre qui suit vise à en décrire les principaux résultats, qui justifient aujourd'hui notre intérêt pour ces nano-objets dans le cadre d'un traitement par radiothérapie synchrotron.

Chapitre 4

Les nanoparticules pour potentialiser la radiothérapie synchrotron

Sommaire

4.1 Motivations : une efficacité thérapeutique observée <i>in vivo</i>	62
4.1.1 Études sur des modèles de tumeurs sous-cutanées	62
4.1.2 Études sur des modèles de tumeurs intracérébrales	64
4.2 Les mécanismes observés à l'échelle de la cellule	66
4.2.1 Toxicité des nanoparticules	66
4.2.2 Internalisation des nanoparticules	67
4.2.3 Réponse cellulaire à une irradiation en présence de nanoparticules	70
4.3 Des explications recherchées à l'échelle moléculaire	72
4.3.1 Hétérogénéité du dépôt de dose	72
4.3.2 Les conséquences à l'échelle tumorale	73

Depuis les dix dernières années, les nanoparticules (NPs) font l'objet d'un intérêt grandissant. Dans le domaine médical, leur potentiel de radiosensibilisation est fortement étudié. Les NPs combinent en effet de nombreux atouts pour cette application : une bonne internalisation par les cellules, une bonne circulation et élimination par voie sanguine *in vivo*, une forte concentration locale d'atomes lourds, ainsi qu'une bonne stabilité dans un milieu biologique [Hain 04]. Dans ce chapitre, nous allons décrire leurs propriétés et mettre en avant leur intérêt pour optimiser la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron.

4.1 Motivations : une efficacité thérapeutique observée *in vivo*

L'utilisation des nanoparticules métalliques (mNPs) pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie, connaît un réel engouement depuis le début des années 2000 et plus particulièrement, depuis la publication des travaux d'*Hainfeld* en 2004 [Hain 04], qui sont décrits ci-dessous. Quelques autres études *in vivo* montrent également un effet dont l'amplitude dépend du mode d'irradiation, des nanoparticules et du modèle tumoral étudié. Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire les principales études traitant de la combinaison rayonnements ionisants + NPs *in vivo* et nous verrons dans quelles mesures elles justifient l'intérêt porté aux NPs pour le renforcement de dose par rayonnement synchrotron.

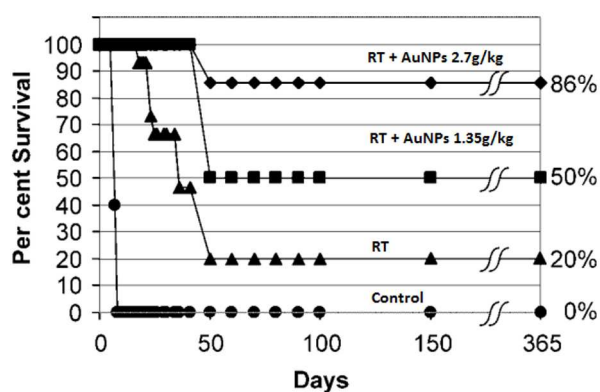
4.1.1 Études sur des modèles de tumeurs sous-cutanées

Dans son étude, *Hainfeld* utilise des nanoparticules d'or (AuNPs) qu'il injecte par voie veineuse pour augmenter l'absorption des rayons X de basse énergie (250 *kVp*) spécifiquement dans la tumeur. Le modèle utilisé est un modèle sous-cutané (cellules EMT-6, carcinome mammaire) implanté chez la souris. Les nanoparticules ciblent de manière passive la tumeur, par effet EPR (cf. paragraphe 1.2.5, p.13). La vascularisation plus importante de la tumeur et la perméabilité de ses vaisseaux permettent aux NPs de s'y concentrer. L'injection des NPs avant l'irradiation (26 *Gy*, 1 fraction - 250 *kVp*) augmente la survie des souris (cf. Fig 4.1(a)), avec un effet proportionnel à la concentration d'or injectée. Une injection de 2.7 *g/kg* conduit à 86% de survie à long terme (≥ 1 an) [Hain 04].

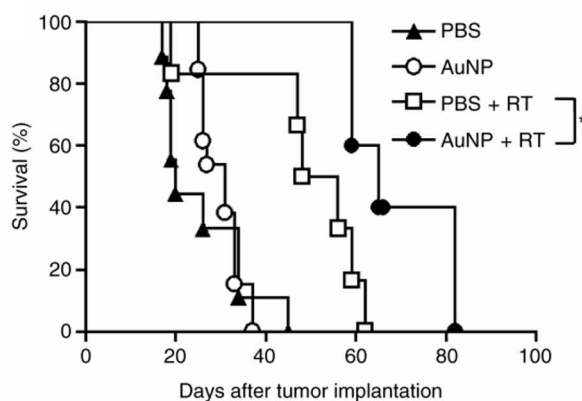
Chang et ses collaborateurs montrent l'intérêt de l'utilisation des AuNPs, en combinaison à une irradiation d'électrons cette fois-ci [Chan 08]. Le modèle tumoral est un mélanome murin (cellules B16F10). Une injection intraveineuse de 200 μl de AuNPs (200 *nM*, 13 *nm*) suivie, 24h après, par une irradiation externe (e^- - 6 *MeV*) conduit à une augmentation de la survie des animaux par rapport à la radiothérapie seule (cf. Fig. 4.1(b)). Les résultats sont cependant moins encourageants que ceux d'*Hainfeld* puisqu' aucune survie à long terme n'est observée.

Une étude plus récente illustre l'intérêt des mNPs (Or et fer, 14 *nm*) en combinaison à la protonthérapie (*p*, 40 *MeV*) [Kim 12]. Les cellules tumorales CT26 sont une fois encore injectées de manière sous-cutanée sur la patte de souris. Les auteurs montrent une efficacité du traitement combiné qui dépend de la concentration des mNPs injectées et de la dose délivrée. Une injection de 300 *mg/kg* de Au ou FeNPs associée à une irradiation (21 *Gy* dans le plateau et 31 *Gy* dans le pic de Bragg) conduit à la guérison de tous les animaux (cf. Fig. 4.1(c)).

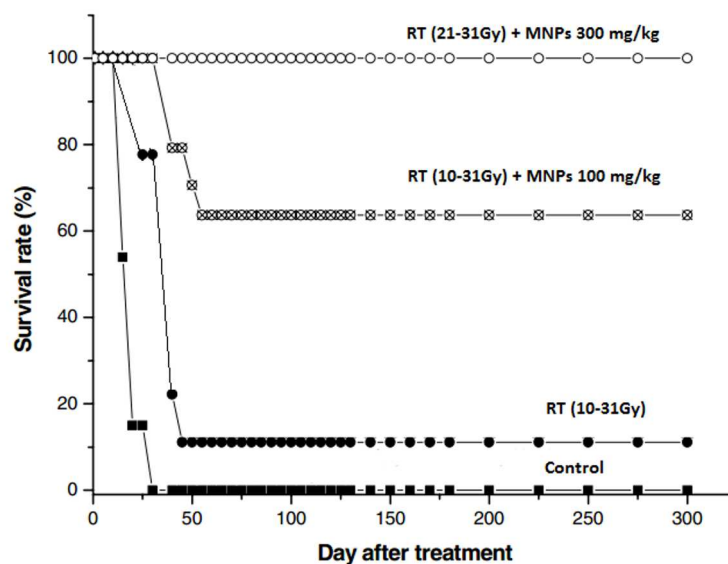
Ces études, bien qu'aux conditions expérimentales différentes, présentent des résultats encourageants. Mais quelle efficacité thérapeutique peut-on envisager sur un modèle orthotopique de gliome ?



(a) Hainfeld 2004, cell. EMT-6, RT : RX 250 kVp, 26 Gy, AuNPs 1.9 nm [Hain 04]



(b) Chang 2008, cell. B16F10, RT : e^- 6 MeV, 25 Gy, AuNPs 13 nm [Chan 08]



(c) Kim 2012, cell. CT26, RT : p 40 MeV, ($D_{plateau}$ - $D_{PicDeBragg}$), Au/FeNPs 14 nm [Kim 12]

FIGURE 4.1 – Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie de souris porteuses d'une tumeur sous-cutanée et traitées par une injection *i.v.* de NPs, suivie d'une radiothérapie externe.

4.1.2 Études sur des modèles de tumeurs intracérébrales

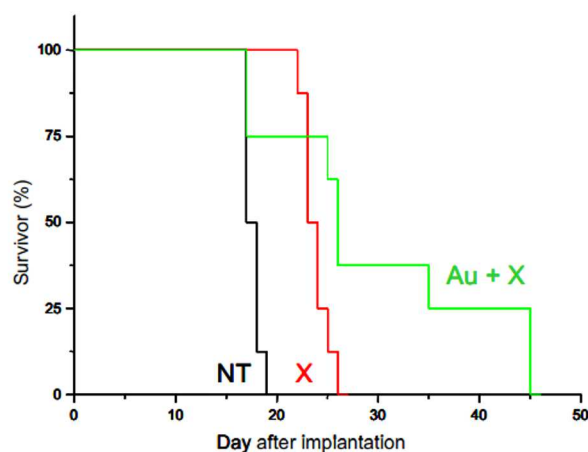
Les nanoparticules métalliques ont également fait l'objet d'études pour le traitement de tumeurs intracérébrales. A notre connaissance, quatre expériences ont été publiées sur le sujet. Deux d'entre elles associent les nanoparticules à une thérapie par micro-faisceaux synchrotron. La première s'intéresse à des NPs d'or qui consistent en un cœur d'atomes d'or ($Z = 79$) entouré d'une enveloppe de DTDTPA. Leur charge négative permet une bonne stabilité colloïdale dans une gamme de pH étendue (entre 2 et 14), grâce à la répulsion des particules entre elles. Les particules peuvent éventuellement être couplées à des ions Gadolinium (Gd^{3+}), ce qui leur permet d'être visibles en IRM. Une injection intraveineuse chez le rat porteur d'une tumeur cérébrale (modèle 9L), suivie d'une irradiation par micro-faisceaux synchrotron (25 μm de large, espacés de 175 μm , $\bar{E}_{ph} = 100$ keV), conduit à une amélioration de leur survie par rapport à la radiothérapie seule mais aucune guérison complète n'est observée (cf. Fig. 4.2(a)) [Roux]. Un mode d'irradiation similaire (50 μm de large, espacés de 211 μm , $\bar{E}_{ph} = 90$ keV) a également été combiné à des NPs d'oxyde de gadolinium (cœur de Gd_2O_3 , 1-3.5 nm). Une fonctionnalisation au DTPA assure leur stabilité colloïdale et un suivi en IRM montre une bonne circulation des NPs dans le sang et une élimination rénale essentiellement. L'accumulation des NPs dans les gliomes (9L) par effet EPR est visible en IRM. Une irradiation par micro-faisceaux 20 minutes après l'injection entraîne un effet bénéfique sur la survie des animaux tandis qu'une irradiation plus rapide (5 minutes après) induit une toxicité (cf. Fig. 4.2(b)) [Le D 11].

La dernière étude publiée par *Hainfeld* porte quant à elle, sur un modèle de tumeur cérébrale implantée chez la souris (cellules TU-2449). Il utilise les mêmes nanoparticules que dans son étude précédente [Hain 04], les injecte par voie veineuse à la concentration de 4 g/kg et irradie la tumeur environ 15h après l'injection (RX 100 kVp - 30 Gy). Les résultats sont bien sûr moins bons que l'étude portant sur le modèle sous-cutané mais tout de même très encourageants puisqu'ils conduisent à 50% de survie des animaux à long terme (cf. Fig. 4.2(c)). Ces résultats positifs doivent cependant être relativisés par rapport à la dose délivrée : 30 Gy en une fraction unique. Cette dose dépasse la dose de tolérance des tissus cérébraux sains et pourrait s'avérer délétère pour les souris.

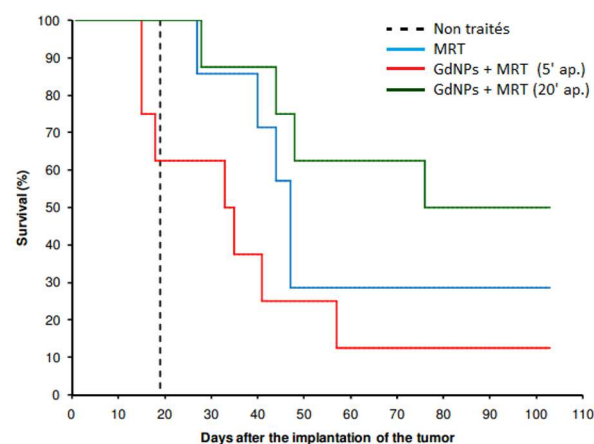
Enfin, des nanoparticules d'or de 15 nm ont été testées en combinaison à une irradiation de basse énergie (rayonnement monochromatique de 88 keV) sur un modèle de rats porteurs d'un gliome F98. Une fraction unique de 15 Gy a été délivrée à la tumeur, quelques minutes après une injection des NPs par voie directe dans le cerveau (125 ou 250 μg , 5 μL). Le toxicité d'une telle injection avait été mesurée au préalable du traitement. Les auteurs montrent que les NPs de 15 nm sont bien tolérées tandis qu'une injection dans les mêmes conditions, de NPs plus petites (1.9 nm) conduit à la mort de 75% des animaux dans les 24h suivant l'injection [Boby 13]. Bien que les auteurs observent une légère amélioration de la médiane de survie des animaux traités par la plus forte concentration de AuNPs, 15 nm (39 j contre 35 pour les animaux traités par radiothérapie uniquement), aucun bénéfice significatif n'a pu être mesuré.

La diversité des résultats obtenus dans ces études, illustre la complexité des effets liés à l'association des NPs et d'un rayonnement de photons. Le bénéfice thérapeutique observé sur quelques modèles, justifie néanmoins l'intérêt que l'on porte depuis quelques années à ce traitement pour la radiosensibilisation des tumeurs cérébrales. Cela demande maintenant une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu pour en optimiser l'efficacité. En effet, la toxicité des nano-objets, ou

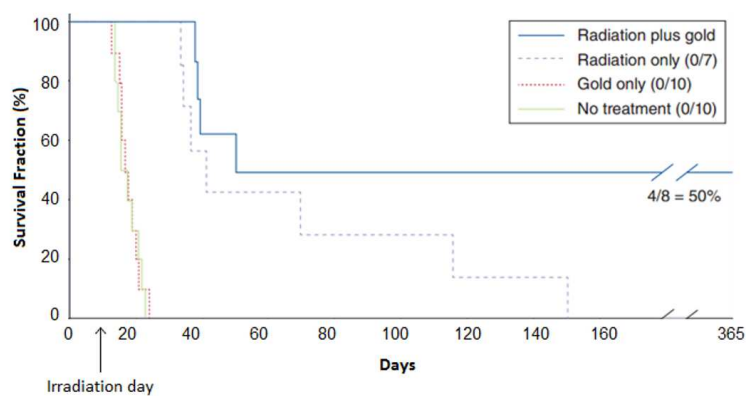
4.1 Motivations : une efficacité thérapeutique observée *in vivo*



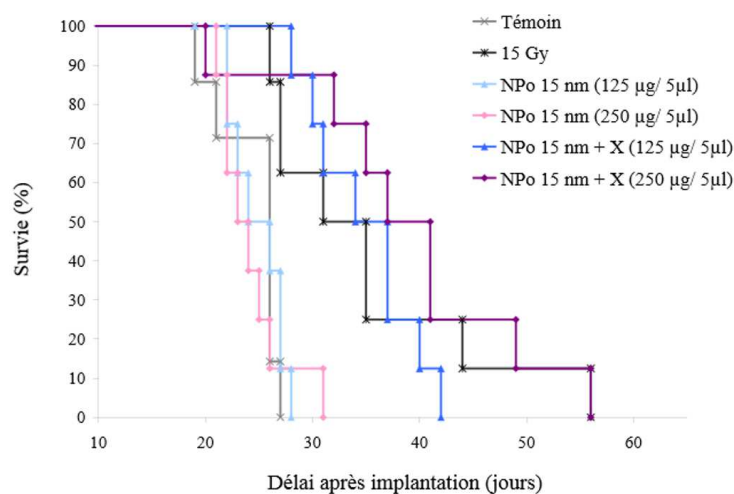
(a) cell. 9L, MRT 100 keV, AuNPs 5 nm [Roux]



(b) cell. 9L, MRT 90 keV, GdNPs 2 nm [Le D 11]



(c) cell. Tu-2449, RX 100kVp - 30Gy, AuNPs 11.2±8.6 nm [Hain 12]



(d) cell. F98, RX 88 keV - 15Gy, AuNPs 15 nm [Boby 13]

FIGURE 4.2 – Courbes de Kaplan-Meier représentant la survie d'animaux porteurs d'un gliome et traités par une injection de NPs suivie d'une radiothérapie externe.

encore les variations des effets entre modèles tumoraux, voies d'injection ou qualités du rayonnement ne sont pas toujours comprises. De nombreuses études *in vitro* ont été publiées sur le sujet. La variation des modèles et des techniques utilisés complique la comparaison des résultats entre eux, mais donne néanmoins d'importantes informations pour la compréhension des effets. Les paragraphes suivants tentent de décrire ces études pour établir un bilan des principaux mécanismes mis en évidence.

4.2 Les mécanismes observés à l'échelle de la cellule

4.2.1 Toxicité des nanoparticules

L'internalisation de nano-objets par les cellules ne peut pas être sans conséquence sur leur activité et leur viabilité. La toxicité des NPs est aujourd'hui devenue une question de société puisque nous les retrouvons dans des circonstances de plus en plus variées (matériaux, fumées, alimentation, *etc*). Leur utilisation dans le domaine médical ne peut pas être envisagée sans tenir compte de leurs conséquences sur le vivant.

De nombreuses études *in vitro* ont permis de caractériser les effets toxiques les plus fréquents après une exposition à des NPs métalliques [Aror 12] [Nel 06]. Les principaux sont :

- Une génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)
- Une perturbation de l'activité mitochondriale
- Une inflammation
- Une dégradation ou dénaturation de protéines
- Une altération du cycle cellulaire
- Une apparition de dommages de l'ADN

Ces différents effets peuvent avoir pour conséquences une perte d'activité de la cellule, une perte d'intégrité (de la membrane par exemple), des mutations, la sénescence ou bien l'activation de la voie apoptotique.

Ces phénomènes sont toujours dépendants de la dose de NPs (concentration et temps d'incubation) [Jena 12] et de la lignée cellulaire [Coul 12]. Ainsi dans son étude, Coulter met en évidence les effets induits sur trois lignées cellulaires différentes (MDA-MB-231, DU145 et L132, les deux premières étant cancéreuses et la troisième, normale), à la suite d'une exposition de plusieurs heures à 12 μM de AuNPs 1.9 nm. Généralement, les cellules tumorales sont beaucoup plus affectées que les cellules normales. Les effets observés sont une altération de la prolifération cellulaire : le retard de croissance est significatif pour les cellules MDA-MB-231 jusqu'à 72h après incubation et les NPs sont suspectées de limiter la cytokinèse¹. L'exposition aux NPs conduit également à une diminution de la viabilité cellulaire qui dépend de la concentration d'incubation. Les doses létales 50% d'exposition aux NPs (AuNPs, 1.9 nm) sont 20 μM , 24.6 μM et 320 μM pour les cellules DU145, MDA-MB-231 et L132 respectivement. L'exposition aux NPs entraînent aussi une modification de l'expression de protéines proapoptotiques caspase 9 et PARP, ainsi qu'une accumulation des cellules en phase sub-G1 dans les lignées cancéreuses. L'accumulation en sub-G1 indique la présence de cellules non viables. Enfin, dès 1 heure d'incubation, le taux de ROS générés dans les cellules augmente de manière significative dans les lignées DU145 et MDA-MB-231.

1. La cytokinèse est la division du cytoplasme dans les dernières phases de la mitose pour former les cellules filles.

4.2.2 Internalisation des nanoparticules

Les NPs sont internalisées par les cellules eucaryotes selon des mécanismes qui commencent à être mieux connus mêmes si les quantités internalisées dépendent encore de paramètres variables propres à chaque lignée cellulaire et au type de particules. Cependant, cette internalisation et la microdistribution des NPs à l'intérieur des cellules jouent un rôle primordial dans l'augmentation de mort cellulaire induite par une irradiation externe. Dans une revue récente, *Canton et Battaglia* décrivent les processus d'internalisation des nano-objets [Cant 12]. Il a été largement montré que l'endocytose est le mécanisme le plus efficace et le plus courant pour l'internalisation de molécules ou de particules externes aux cellules. Ce mécanisme comporte quatre principales étapes qui sont :

- un événement de liaison à la membrane.
- une déformation de celle-ci pour envelopper les NPs.
- l'internalisation des NPs sous forme d'une vésicule dans le cytoplasme.
- le transport de la vésicule puis sa fusion avec un organelle sub-cellulaire (lysosome, ribosome...).

L'endocytose emprunte différentes voies qui dépendent principalement de la taille des particules à internaliser. La figure 4.3 illustre ces différents mécanismes. La phagocytose est spécifique de quelques types cellulaires, tandis que la pinocytose est une fonction commune à de nombreuses cellules. Les protéines impliquées dépendent essentiellement de la taille des nano-objets.

Une fois internalisées, les vésicules (de l'ordre de 300 à 500 nm) évoluent dans la cellule. Elles se déplacent généralement en direction du noyau avec une vitesse moyenne de $10.2 \pm 1.8 \mu\text{m}/h$ et se retrouvent dans les lysosomes (organelles finaux) après environ quarante minutes d'incubation (mesures réalisées par microscopie sur des cellules MCF-7 en présence de AuNPs [Chit 09]).

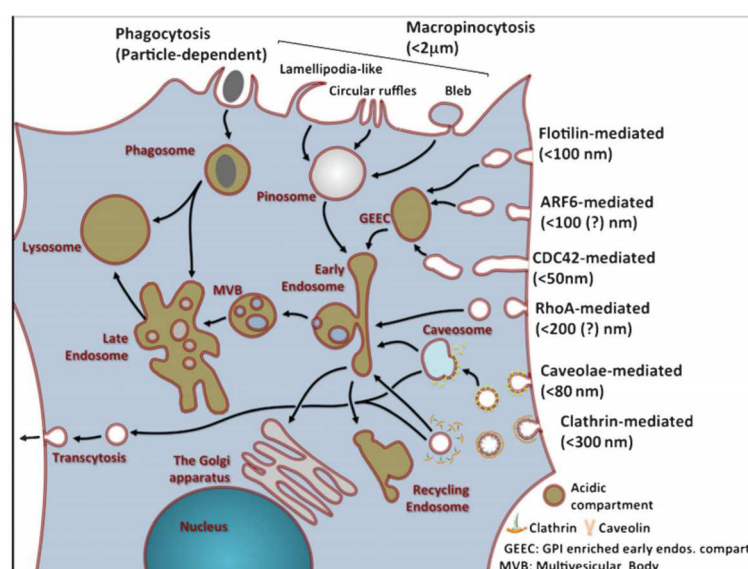


FIGURE 4.3 – Représentation schématique des mécanismes d'endocytose en fonction de la taille de la particule internalisée chez une cellule eucaryote. Figure extraite de [Cant 12].

L'internalisation des nanoparticules dépend de cinq paramètres principaux : la taille, la forme, la chimie de surface, la topologie et les propriétés mécaniques des nanoparticules. Les différentes études publiées ne sont pas toujours en accord sur la dépendance de l'internalisation à ces différents critères mais nous pouvons cependant en extraire des tendances, au moins sur les trois premiers, les deux derniers ayant moins été étudiés.

Taille et forme des NPs : De nombreuses études théoriques et expérimentales s'accordent pour montrer qu'il existe un diamètre optimal pour l'internalisation des nanoparticules sphériques. *Lipowsky et al.*, un groupe de pionniers dans l'étude théorique de ce phénomène, explique que lorsque la membrane phospholipidique enveloppe les nanoparticules, l'attraction entre la surface courbée de la nanoparticule et la membrane de la cellule produit la déformation nécessaire pour "engloutir" cette première. Ce processus dépend à la fois des forces d'adhésion entre la membrane et les nanoparticules, et de la rigidité de la membrane. Les modèles convergent pour affirmer qu'une taille optimale de 20-30 nm de diamètre est nécessaire pour observer une internalisation efficace [Tzli 04] [Gao 05] [Yuan 10] [Chau 11]. De manière plus générale, si on considère différentes formes de NPs, leur internalisation sera fortement influencée par leur surface en contact avec la membrane.

En parallèle, *Sun et al.* montrent que si on ajoute un critère supplémentaire aux modèles théoriques (à savoir une contrainte liée au cytosquelette, alors que les autres se basent uniquement sur les déformations de la membrane), les nanoparticules de plus petite taille peuvent également être internalisées [Sun 06]. En accord avec ce dernier résultat, *Rima* et ses collaborateurs ont montré que des nanoparticules de Gadolinium ultra fines ($< 5\text{ nm}$) pouvaient être internalisées à la fois par diffusion passive (environ 5%) et par macropinocytose (environ 95%) [Rima 13]. La diffusion passive est un processus purement mécanique qui ne dépend pas de l'activité biologique de la membrane puisque l'effet est observé pour une incubation à 4°C. Les particules très fines diffusent librement à travers les pores de la membrane cellulaire et se distribuent de manière assez homogène à l'intérieur du cytoplasme. A l'inverse, le phénomène de macropinocytose est fortement lié à l'activité de la cellule. Il se déroule en deux étapes successives. La première consiste à l'agglomération des NPs à proximité de la membrane. La deuxième correspond à l'internalisation de l'agglomérat formé par des lamellipodes (ou "bras membranaires"). La formation d'agglomérats de NPs à proximité des cellules dépend fortement de leurs propriétés physico-chimiques (potentiel zeta principalement) qui définissent la taille des agrégats et leur distance à la membrane. La figure 4.4 illustre le phénomène de macropinocytose observé chez des cellules SQ20B lors d'une incubation en présence de GdNPs ultra fines ($< 5\text{ nm}$). Les NPs internalisées par diffusion passive ne sont pas visibles en TEM car trop petites (NPs diffuses, non regroupées en agglomérats).

Propriétés de surface des NPs : La chimie de surface des nanoparticules constitue un autre point essentiel pour leur internalisation. Considérant la charge de celles-ci, il a été montré que les particules cationiques avaient une plus forte probabilité d'être internalisées et ce, en raison de leur grande affinité pour les protéoglycanes² chargés négativement et exprimés à la surface de la plupart des cellules [Peru 08]. Cependant les nanoparticules cationiques ont souvent été montrées plus toxiques, pouvant induire des dommages mitochondriaux et l'apoptose chez les cellules euca-

2. Un protéoglycane est une molécule complexe constituée d'une protéine centrale et de chaînes latérales (glucose amino-glycane) qui est produite au niveau de l'appareil de golgi et du réticulum endoplasmique et qui peut ensuite être intégrée à la membrane plasmique ou être excrétée.

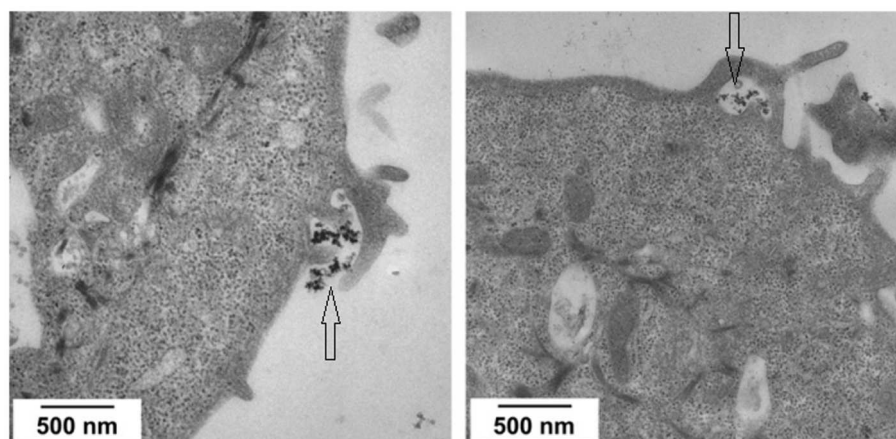


FIGURE 4.4 – Images de Microscopie Électronique à Transmission montrant la formation d'un macropinosome. Les cellules SQ20B sont incubées en présence de GdNPs ultrafines ($< 5 \text{ nm}$) qui s'agglomèrent en surface avant d'être internalisées par macropinocytose [Rima 13].

ryotes [Mogh 02] [Mogh 05] [Xia 08]. Un autre point critique semble être la stabilité colloïdale des nanoparticules en milieu biologique. Cette stabilité est due à l'équilibre des forces électrostatiques exercées entre les NPs en solution. Beaucoup d'études *in vitro* montrent que l'internalisation est fortement liée à cette stabilité et que la formation d'agrégats dans le milieu de culture des cellules joue en défaveur de l'internalisation [Qiu 10] [Alba 11]. La stabilité colloïdale peut être fortement améliorée avec le recouvrement des nanoparticules par des chaînes de polymères dont les propriétés (longueurs, liaisons...) ont chacune leur importance.

Lignée cellulaire : Toutes les cellules n'internalisent pas de la même façon un type de NPs donné. Coulter *et al.* montrent par exemple que des AuNPs de 1.9 nm de diamètre se concentrent beaucoup plus dans deux lignées cancéreuses (MDA-MB-231 et DU145) que dans une lignée normale (L132) (facteurs 17 et 14 pour MDA-MB-231 et DU145 en comparaison à la lignée L132, respectivement). La concentration de NPs internalisées tend vers un plateau au bout d'environ 6h quelques soit la lignée incubée. Ce phénomène de saturation est observé dans la grande majorité des études portant sur le sujet.

Augmenter l'internalisation *via* le ciblage : Dans un monde idéal, l'internalisation des NPs pour l'augmentation de l'efficacité de la radiothérapie, se ferait de manière spécifique dans les cellules tumorales. Les études pour le ciblage des cellules cancéreuses sont relativement nombreuses mais souvent confrontées aux mêmes limites. Le principe est le suivant : Les cellules tumorales possèdent fréquemment des récepteurs membranaires que les cellules saines n'expriment pas, ou à plus faible fréquence. Les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des anticorps complémentaires de ces récepteurs (VEGF, HER-2...) pour favoriser les liaisons membranes/NPs, de manière spécifique avec les cellules tumorales et augmenter la concentration intracellulaire de NPs. Les études *in vitro* présentent des résultats positifs [Chat 10], mais l'application *in vivo* reste compromise puisque tous les cancers n'expriment pas les mêmes récepteurs (y compris, pour différents cancers de même nature). D'autre part, à l'intérieur d'une même tumeur il existe très souvent différentes populations cellulaires qui n'ont pas les mêmes propriétés. Un ciblage très spécifique conduit ainsi à épargner

des cellules tumorales.

4.2.3 Réponse cellulaire à une irradiation en présence de nanoparticules

Observations *in vitro* : De nombreuses études *in vitro* présentent les résultats de la radiosensibilisation induite par une irradiation de rayons X en présence de NPs métalliques. Les conditions expérimentales sont très variables (lignée cellulaire, NPs, incubation, irradiation, *etc*) et compliquent la comparaison des études entre elles. Cependant, dans certains cas, plusieurs effets se recoupent et permettent de mettre en avant différents mécanismes impliqués dans le traitement $RX + NPs$. Le tableau 4.1 regroupe les principales études publiées depuis 2009 sur ce sujet. L'interprétation des résultats sera faite dans les paragraphes qui suivent.

Étude	Cellules	NPs	Incubation	Localisation NPs	Énergie RX	Radiosen-sibilisation
Kong 2008	MCF-10A (épithéliale mammaire, saine)	Glu-AuNPs (glucose)	15 nM	cytoplasme	200 kVp	OUI pour 200 kVp seulement
	MCF-7 (sein, cancéreuse)	AET-AuNPs (charge +)	2h	Membrane	660 keV 1.25 MeV	
Rahman 2009	BAECs (endothéliale aorte bovine)	AuNPs 1.9 nm	0.13-1.0 mM 24h	cytoplasme (Cluster)	150 kVp 80 kVp	OUI
Chithra-ni 2010	Hela (cervicale, cancéreuse)	AuNPs 14, 50 et 74 nm	7.10 ⁹ $part/mL$ 24h	cytoplasme (vésicules)	105 kVp 220 kVp 6 MVp	OUI pour basses E et très faible pour 6 MVp
Jain 2010	L132 (pulmonaire, saine)	AuNPs 1.9 nm	12 μM 24h	cytoplasme (lisosomes)	160 kVp	OUI pour MDA-MB-231 seulement
	DU145, MDA-MB-231 (prostate et sein,) (cancéreuses)				6 MV 15 MV	
Chatto-padhyay 2010	SK-BR-3 (sein, cancéreuse)	30 nm PEG-AuNPs ou trastuzumab/PEG-AuNPs	2.10 ¹¹ $part/mL$ 12h	cytoplasme et membrane	300 kVp	OUI
Mowat 2011	U87 (gliome)	DTPA/GdNPs < 5 nm	0.1-10 mM 1h		6 MV 660 keV	OUI pour 0.5 mM seulement

TABLE 4.1 – Récapitulatif des principales études portant sur la radiosensibilisation *in vitro* par l'irradiation X en présence de NPs métalliques.

Dépendance de l'effet à la lignée cellulaire : Les études publiées par *Kong*, *Butterworth* et *Rahman*, mettent en avant un point crucial. La réponse biologique est fortement dépendante de

la lignée cellulaire étudiée. De manière générale, les cellules saines répondent moins positivement au traitement que les cellules cancéreuses [Kong 08] [Jain 10]. Mais cela n'est pas toujours aussi simple, comme le montre *Jain* et ses collaborateurs : Pour une même quantité de AuNPs internalisées, les cellules cancéreuses DU145 et MDA-MB-231 ne répondent pas de la même manière à une irradiation X . Les premières ne présentent pas d'augmentation de sensibilité aux rayonnements, tandis que les secondes observent un facteur d'augmentation de sensibilité (SER) de 1.41 pour une irradiation à 160 kVp [Jain 10].

Dépendance de l'effet à la concentration de NPs : L'amplitude de l'augmentation de la sensibilité des cellules dépend toujours de la concentration en NPs. *Chithrani* fait par exemple le rapprochement entre radiosensibilité et quantité de NPs internalisées. En effet, dans cette étude, les auteurs montrent que les NPs les plus efficacement internalisées sont celles de 50 nm de diamètre. La concentration internalisée est supérieure aux deux autres tailles de NPs étudiées (14 et 74 nm). L'augmentation de la radiosensibilisation est directement reliée à la quantité de particules internalisées puisqu'une irradiation à 220 kVp conduit à des SER de 1.43, 1.20 et 1.26 pour des NPs de 50, 14 et 74 nm respectivement [Chit 10a]. *Rahman* observe une tendance similaire [Rahm 09] sur des cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) irradiées en présence de AuNPs de 1.9 nm . A l'inverse, l'étude de *Mowat* sur les NPs ultra fines de gadolinium ($< 5 nm$) présente une relation différente à la concentration. Les auteurs montrent un effet spécifique pour une concentration d'incubation de 0.5 mM , alors que la quantité de NPs internalisées augmente linéairement avec la concentration d'incubation au moins jusqu'à 2.5 mM . L'hypothèse proposée pour expliquer le phénomène implique le fait que l'agrégation des NPs pour les concentrations plus fortes limite l'efficacité thérapeutique [Mowa 11].

Dépendance de l'effet à l'énergie des photons incidents : Aux vues des différences d'interaction des photons dans la matière (et en particulier sur les atomes lourds) en fonction de leur énergie, on s'attend à observer une augmentation de radiosensibilité différente selon l'énergie du rayonnement. Ce paramètre a été mis en évidence par plusieurs études. Les cellules HeLa irradiées en présence de AuNPs à 105 kVp ou 6 MV présentent un SER de 1.66 ± 0.05 et 1.17 ± 0.02 respectivement. Le SER supérieur à 1 pour une irradiation à 6 MV est attribué par les auteurs, aux photons de basse énergie (de l'ordre de 100 keV) présents dans le faisceau (faisceau polychromatique) [Chit 10a]. Dans son étude, *Rahman* observe une radiosensibilité des cellules BAECs irradiées en présence de AuNPs (1.9 nm), plus importante à 80 kVp qu'à 150 kVp [Rahm 09], mettant ainsi en avant, l'avantage des plus basses énergies. Les résultats de *Jain* sont plus controversés. Il observe des SER de 1.41, 1.29 et 1.16 pour une irradiation à 160 kVp , 6 MV et 15 MV respectivement (cellules MDA-MB-231, AuNPs 1.9 nm). Les différences de SER ne sont pas significatives et plus surprenant encore, les mêmes irradiations conduites sur d'autres lignées cellulaires (DU145 et L132) ne conduisent à aucune augmentation de la radiosensibilité, quelque soit l'énergie des photons incidents (SER : 0.97-1.08) [Jain 10].

Dépendance de l'effet à la localisation des NPs : Enfin, la microdistribution des NPs au moment de l'irradiation semble avoir un effet important sur l'efficacité thérapeutique. Des NPs d'or fonctionnalisées par deux molécules différentes sont évaluées sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7. La fonctionnalisation est réalisée avec du thioglucose (pour cibler les cellules aux besoins accrus en glucose) Glu-AuNPs, ou avec une cysteamine (charge positive très importante) AET-AuNPs. Les propriétés de surface des NPs sont fortement modifiées par la fonctionnalisation,

entraînant une forte augmentation de l'internalisation des NPs par rapport aux NPs non vectorisées (facteur 3 pour Glu-AuNPs et facteur 12 pour AET-AuNPs). Du fait de leur charge positive, les AET-AuNPs se trouvent préférentiellement sur la membrane des cellules. A l'inverse, les Glu-AuNPs sont internalisées dans le cytoplasme. En combinaison à une irradiation externe (RX 200 kVp), et malgré la plus forte concentration de AET-AuNPs, ce sont les Glu-AuNPs qui conduisent à une plus forte augmentation de la radiosensibilité (63.5% d'augmentation par rapport à une irradiation seule contre 31.7% pour les AET-AuNPs) [Kong 08]. Ce résultat semble indiquer que l'hétérogénéité de dose induite par la présence des NPs doit être mise en relation avec la distribution subcellulaire des NPs pour discuter de l'efficacité biologique de l'irradiation.

4.3 Des explications recherchées à l'échelle moléculaire

Des explications ont été proposées à une échelle encore plus petite que celle de la cellule. Dans cette partie, nous allons décrire les études expérimentales qui ont mis en évidence une forte augmentation de dose locale autour des NPs lorsqu'elles sont irradiées par des rayonnements ionisants de faible énergie. Cette hétérogénéité de dose a également été calculée par simulations Monte Carlo mais ce point sera discuté plus tard (cf. partie 8.2, p. 132) et nous ne décrirons ici que les résultats expérimentaux.

4.3.1 Hétérogénéité du dépôt de dose

La présence de nanoparticules métalliques dans un milieu biologique entraîne une hétérogénéité de densité et modifie les propriétés d'absorption des rayonnements ionisants lorsque ce milieu est irradié. Le dépôt de dose dans le milieu ne peut plus être considéré comme homogène puisque les fortes ruptures de densités conduisent à d'importantes différences de doses à l'échelle du nanomètre. Le calcul de dose à cette échelle est très complexe. Les méthodes de simulation Monte Carlo sont performantes mais la dimension nanométrique des volumes nécessite des temps de calculs considérables (indispensables pour obtenir une statistique d'évènements acceptable et le suivi des particules avec une énergie de coupure de l'ordre de la dimension des volumes), limitant souvent les simulations à des géométries relativement simples. Aujourd'hui, le programme *Geant-4 DNA* est développé dans ce sens. Il vise à simuler le dépôt de dose à l'échelle de l'ADN. Ce programme est pour le moment développé pour la simulation des traces d'ions lourds mais commence aussi à s'étendre aux rayonnements de photons.

Plusieurs études expérimentales mettent en évidence l'hétérogénéité du dépôt de dose induite par la présence des nanoparticules. Ainsi, Zheng et ses collaborateurs utilisent des fragments d'ADN (plasmides) déshydratés pour montrer que la présence d'AuNPs en combinaison à une irradiation d'électrons (60 keV) augmente considérablement le taux de cassures simple et double brins [Zhen 09]. Les nanoparticules se lient par liaisons électrostatiques à l'ADN et se trouvent au contact de la molécule pendant l'irradiation. L'augmentation des dommages est attribuée à l'augmentation de l'émission d'électrons de faible énergie produits dans la nanoparticule. Les auteurs mesurent un taux d'électrons 9 fois plus important en présence de NPs, facteur qui correspond au rapport des coefficients d'absorption des électrons de 60 keV dans l'or et dans les tissus biologiques. Ces électrons déposent leur énergie dans une région d'environ 10 nm autour de la particule, entraînant une forte augmentation de la densité d'ionisations localement et donc de la complexité des dommages puisque les NPs sont au contact de l'ADN. La probabilité de créer une CDB par fusion

de deux ionisations distinctes dans une région d'une dizaine de paires de bases est très élevée à proximité de la nanoparticule.

L'étude de *Butterworth* s'accorde à celle de *Zheng* pour montrer la forte augmentation d'ionisations au voisinage direct des nanoparticules (quelques *nm*). Cette étude utilise également des plasmides, irradiés cette fois-ci par des rayons *X* (160 *kVp*) en milieu aqueux. Différentes tailles de nanoparticules d'or sont considérées. Les résultats montrent une augmentation des cassures qui est attribuée au fort taux d'électrons de faible énergie et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, visibles en milieu aqueux, suite à la radiolyse de l'eau) [Butt 08]. Le taux de cassures dépend de l'énergie des photons incidents (un pic énergétique à 80.7 *keV*, au dessus du K-edge de l'or maximise l'émission de photo-électrons et d'électrons Auger suite à une interaction par effet photoélectrique en couche *K*), de la taille des NPs (une nanoparticule de petite taille induit plus de dommages qu'une nanoparticule de plusieurs dizaines de *nm*) et des propriétés chimiques du milieu. L'ajout d'une solution qui capture les radicaux libres (DMSO par exemple) diminue fortement le nombre de cassures et illustre le fait qu'en milieu aqueux, les dommages indirects sont majoritaires [Cart 07].

4.3.2 Les conséquences à l'échelle tumorale

Les études citées plus haut montrent que l'hétérogénéité du dépôt de dose au voisinage d'une nanoparticule s'étend sur une très petite région (nanométrique). La réponse cellulaire, et la réponse tumorale encore plus, devraient donc être fortement influencées par la localisation des NPs au moment de l'irradiation. Cette information illustre la complexité de la modélisation du dépôt de dose dans des systèmes biologiques où de nombreux paramètres influencent la distribution des NPs (pression, vascularisation, voie d'injection, *etc*).

L'étude de *Berbeco* illustre les conséquences biologiques que peut avoir une distribution hétérogène des nanoparticules dans une tumeur. L'étude s'appuie sur l'hypothèse que les AuNPs se distribuent préférentiellement sur les parois internes des vaisseaux, au contact des cellules endothéliales. Il est bien connu que la croissance tumorale est fortement liée à sa vascularisation et par conséquence, l'altération préférentielle de ces cellules peut être dramatique pour le développement d'une tumeur. La figure 4.5(a) représente la géométrie utilisée pour la simulation du dépôt de dose. Les cellules sont irradiées par un faisceau polychromatique de photons de 6 *MV* en présence de différentes concentrations d'or. L'auteur calcule l'augmentation de dose due aux nanoparticules dans les cellules endothéliales (EDEF pour Endothelial Dose Enhancement Factor). Il montre que cette augmentation est principalement due à la composante de faible énergie du faisceau (de l'ordre de 100 *keV*) (cf. Fig. 4.5(b)) et qu'une concentration de 30 *mg Au/g* entraîne une augmentation de 70% de la dose déposée dans les cellules endothéliales [Berb 11]. L'augmentation de dose dans la tumeur (Macroscopic DEF) est bien sûr beaucoup plus faible (cf. Fig. 4.5(c)). Du fait de l'importance des cellules endothéliales pour la prolifération tumorale, il est probable que la dose macroscopique ne reflète plus la réponse biologique.

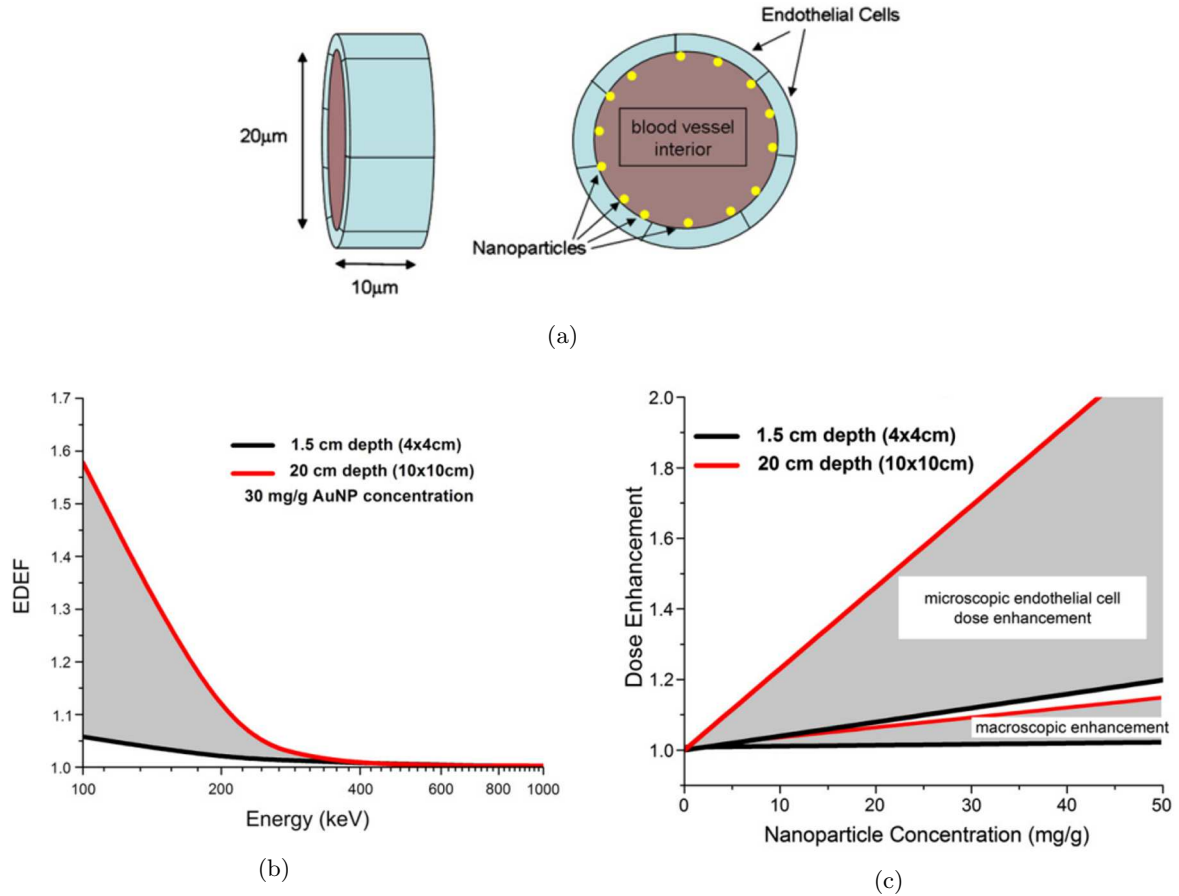


FIGURE 4.5 – (a) Géométrie utilisée pour l'étude de *Berbeco et al.* [Berb 11], représentant une section d'un capillaire avec des AuNPs distribuées sur les parois internes des cellules endothéliales. (b) Endothelial dose enhancement factor (EDEF) calculé en fonction de la fluence énergétique du faisceau de photons, pour 30 mg/mL AuNPs. (c) Comparaison des facteurs d'augmentation de dose calculés à 6 MV par une approche macroscopique (DEF) ou microscopique (EDEF) en fonction de la concentration de NPs présentes pendant l'irradiation.

Problématique

Nous avons vu dans cette première partie que les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus agressives. Les traitements actuellement disponibles ne permettent qu'un soin palliatif qui augmente de plusieurs mois la survie des patients, mais ne les guérit pas complètement. La radiothérapie externe est une option intéressante pour le traitement de ces tumeurs puisqu'elle s'affranchit des problèmes rencontrés par la chirurgie et la chimiothérapie. La seule limite de la radiothérapie externe pour le traitement des gliomes réside dans la tolérance de dose des tissus cérébraux sains qu'il ne faut pas dépasser. Plusieurs options sont envisageables pour augmenter le différentiel de dose entre les tissus cérébraux sains et tumoraux. Et nous nous intéresserons ici tout particulièrement à la méthode de la SSRT, ou radiothérapie synchrotron, qui a été décrite au chapitre 3, p.45.

La radiothérapie synchrotron utilise la forte absorption des rayons X par les atomes lourds pour renforcer la dose de manière spécifique dans une tumeur cérébrale. L'accumulation d'un agent de contraste (AC), composé moléculaire de numéro atomique élevé ($Z > 50$), dans la tumeur, peut se faire grâce à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique au niveau de celle-ci. Cette technique fait actuellement l'objet d'essais cliniques à l'ESRF. Des efforts de recherches sont menés en parallèle pour optimiser l'effet de la radiothérapie synchrotron.

A mon sens, deux pistes principales peuvent être explorées : l'optimisation du dépôt de dose à l'échelle cellulaire pour augmenter l'efficacité biologique *via* l'amplification et la complexification des dommages radio-induits et l'optimisation de la distribution des atomes lourds dans la tumeur. Sans un recouvrement total, le succès de la technique ne peut pas être garanti.

Ce travail de thèse s'est organisé autour de deux objectifs principaux :

1. L'étude du potentiel des NPs métalliques pour la radiothérapie synchrotron, qui s'est décliné en deux parties :
 - L'évaluation de la toxicité et de la distribution subcellulaire des NPs internalisées.
 - La mesure de radiosensibilisation induite par les NPs.
2. La caractérisation de la biodistribution des NPs injectées directement dans la tumeur, à l'aide d'une nouvelle technique de tomographie synchrotron à deux énergies pour l'imagerie simultanée et quantitative de deux éléments lourds dans le cerveau.

Potentiel des NPs métalliques pour la radiothérapie synchrotron

Pourquoi ? Les NPs métalliques présentent de nombreux avantages, à savoir, une forte concentration d'atomes lourds, la capacité à être internalisées par les cellules eucaryotes, une bonne circulation *in vivo* ainsi qu'une bonne stabilité en milieu biologique et donc une (relativement) faible toxicité. Ces caractéristiques en font un bon candidat pour le renforcement de dose par effet photoélectrique, avec deux atouts majeurs par rapport à un agent de contraste classique : l'internalisation des NPs par les cellules permet une forte proximité des atomes lourds aux cibles biologiques critiques (ADN, protéines, membranes...) et l'assemblage des atomes lourds sous forme de NPs permet d'augmenter l'hétérogénéité du dépôt de dose à l'échelle nano/micrométrique et d'augmenter de manière très importante le TEL du rayonnement X aux alentours des NPs.

Comment ? L'étude du potentiel des NPs pour la radiothérapie synchrotron s'est divisée en plusieurs étapes, à savoir, l'étude de l'internalisation des NPs avec les cellules F98 (modèle cellulaire de gliome de rat), l'évaluation de leur toxicité sur cette même lignée cellulaire et la quantification de leur capacité à radiosensibiliser. La dépendance de la radiotoxicité à l'énergie des photons incidents, la comparaison de la réponse cellulaire à celle obtenue avec un agent de contraste et le calcul macroscopique de l'augmentation de dose sont autant d'éléments que nous avons investigués pour caractériser la nature des effets observés. Enfin, les NPs d'or ont été utilisées *in vivo* sur des rats porteurs d'un gliome dans le cadre d'un traitement de radiothérapie synchrotron.

Quels outils ? Pendant ces trois années, nous avons travaillé avec trois types de NPs différents. Les premières sont des NPs de gadolinium (GdNPs) ultrafines ($< 5 \text{ nm}$). Le gadolinium a un double intérêt en imagerie puisqu'il produit à la fois un contraste en IRM et à la fois un contraste en imagerie X ($Z = 64$). Les NPs sont fonctionnalisées par du DTPA pour améliorer leur stabilité en milieu biologique. Une fonctionnalisation au FITC permet également de les suivre par fluorescence. Les autres NPs étudiées sont des NPs d'or et de platine ($Z_{Au} = 79$ et $Z_{Pt} = 78$), de diamètres 13 et 6 nm respectivement, et qui sont cette fois-ci fonctionnalisées par un peptide qui cible spécifiquement un récepteur de la membrane nucléaire. Cette fonctionnalisation devrait permettre une localisation privilégiée des NPs au niveau des noyaux cellulaires et, théoriquement, potentialiser l'effet d'une irradiation X. Une description plus complète des différentes NPs est fournie en introduction de la prochaine partie (cf. chapitre 5.2, p. 83).

Distribution des NPs dans le cerveau

Pourquoi ? La distribution des NPs dans la tumeur est directement liée à la dose et par conséquent à l'efficacité de la radiothérapie synchrotron. Il est indispensable de la connaître (de manière quantitative et relative au volume tumoral) pour estimer la dosimétrie d'un traitement.

Comment ? Une méthode de tomographie à deux énergies, qui repose sur l'acquisition simultanée d'une même coupe tomographique avec deux faisceaux d'énergies différentes, a été utilisée pour cette étude. Cette méthode permet de séparer trois éléments mélangés dans un même volume. Elle a été implémentée sur la ligne médicale de l'ESRF au début de ce projet et nous nous attachons dans ce travail à la caractériser et à l'utiliser pour imager simultanément une tumeur cérébrale (mise en évidence par une prise de contraste iodé) et son recouvrement par des NPs de gadolinium

injectées localement. La prise de contraste iodé que l'on image *in vivo* sera ensuite comparée au volume tumoral réel, imagé par histologie, contraste de phase X et IRM anatomique.

Quels outils ? Les NPs de gadolinium décrites plus haut sont injectées par CED, directement dans tumeur cérébrale développée chez le rongeur. Le volume tumoral est mis en évidence par une prise de contraste iodé (liée à la perméabilité de la BHE au niveau du gliome). Les deux éléments lourds sont imagés de manière simultanée et quantitative par la méthode de tomographie à deux énergies que nous décrivons plus loin (cf. chapitre IV, p. 175). L'IRM anatomique haute résolution et la tomographie X par contraste de phase ont été utilisées sur les cerveaux excisés, afin de comparer les volumes tumoraux réels à la distribution de l'AC *in vivo*.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de trois parties indépendantes. La première présente les études concernant la caractérisation de l'interaction des NPs avec les cellules F98. Nous décrirons leur internalisation, leur distribution à l'échelle de la cellule ainsi que leur toxicité propre, sans combinaison à une irradiation.

La deuxième partie décrit la réponse cellulaire suite à l'association des NPs et d'une irradiation X monochromatique. Nous tenterons de décrire la biodosimétrie mise en jeu grâce à la comparaison de l'effet à celui induit par un agent de contraste classique. Nous comparerons également la réponse biologique au facteur d'augmentation de dose (DEF) calculé de manière macroscopique.

Enfin, la dernière partie de cette thèse présente l'étude de la distribution des NPs dans le cerveau réalisée suite à la mise en place d'une nouvelle technique de tomographie synchrotron, à deux énergies.

Deuxième partie

Toxicité et internalisation des nanoparticules

Chapitre 5

Le modèle expérimental

Sommaire

5.1	Gliome F98	82
5.1.1	Modèle cellulaire	82
5.1.2	Modèle tumoral	82
5.2	Les nanoparticules de gadolinium (GdNPs)	83
5.3	Les nanoparticules d'or et de platine (AuNPs - PtNPs)	85

Cette seconde partie de manuscrit tente de décrire la réponse des cellules malignes F98 en termes de cytotoxicité et d'internalisation, lorsqu'elles sont exposées à différentes nanoparticules et pour différentes conditions d'incubation.

Dans le premier chapitre, nous décrirons le modèle de gliome étudié (cellulaire et *in vivo*) ainsi que les trois types de NPs utilisés au cours de ce travail de thèse. Les premières sont des nanoparticules de gadolinium ultra fines (3 nm) et fluorescentes. Les secondes et troisièmes sont des nanoparticules d'or (13 nm) et de platine (6 nm) vectorisées par deux peptides différents, spécifiques d'un récepteur nucléaire. Un prochain chapitre décrira ensuite les méthodes expérimentales, avant d'exposer les résultats relatifs à cette étude.

5.1 Gliome F98

5.1.1 Modèle cellulaire

Le modèle cellulaire F98 est un modèle de gliome de rongeur. Il a été isolé dans les années 60s par *Weschler* (Ohio State University), sur des rats ayant développé des tumeurs spontanées suite à une injection intra-veineuse de Nitrosuré (N-ethyl-N-nitrosourea) chez leur mère. La lignée cellulaire utilisée au laboratoire provient du centre de ressources biologiques ATCC (*American Type Culture Collection*). Les cellules sont majoritairement fusiformes (cf. Fig. 5.1). Elles ont un diamètre moyen de $10\ \mu\text{m}$ et un temps de doublement *in vitro* de 19h. Elles sont cultivées en adhérence et leur taux de survie en conditions normales de culture (Plating Efficiency) oscille entre 60 et 70% pour nos expériences. Une analyse transcriptomique a récemment été initiée au laboratoire, mais les résultats n'étant pas encore définitifs, nous ne pouvons détailler plus précisément le profil génétique de la lignée.

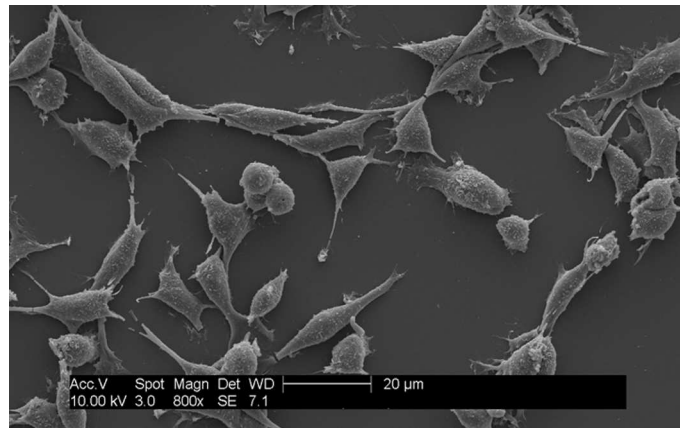


FIGURE 5.1 – Cellules F98 imagées par microscopie électronique à balayage ($\times 800$). Les cellules sont majoritairement fusiformes et ont un diamètre moyen de $10\ \mu\text{m}$.

5.1.2 Modèle tumoral

L'analyse histopathologique du gliome F98 a permis de le classer dans la catégorie des gliomes anaplasiques ou indifférenciés [Ko 80]. Il est caractérisé par sa faible immunogénicité¹ et sa prolifération au caractère infiltrant [Bart 09] [Mata 94]. Ces caractéristiques en font un modèle relativement comparable aux glioblastomes humains. La croissance tumorale est exponentielle. L'injection de 1000 cellules tumorales dans le noyau caudé du rat provoque la croissance d'une tumeur qui atteint 3 à 4 mm de diamètre et un volume de 20 à 30 μL , 13 jours après l'implantation des cellules [Four 03]. La figure 5.2(a) illustre la relation logarithmique qui a été observée au laboratoire, entre le nombre de cellules injectées chez l'animal et sa survie.

1. Un composé immunogène est reconnu comme étranger par l'organisme et provoque la production d'anticorps spécifiques capables de le neutraliser.

La figure 5.2(b) représente une coupe histologique d'un gliome F98 qui s'est développé dans l'hémisphère droit du cerveau d'un rat. La masse tumorale principale est bien différenciée des tissus sains, mais on observe des îlots de cellules malignes infiltrées dans le tissu sain. Le cœur plus clair de la tumeur est vide de cellules. Cette particularité est due au protocole d'injection des cellules tumorales qui utilise une solution d'agarose.

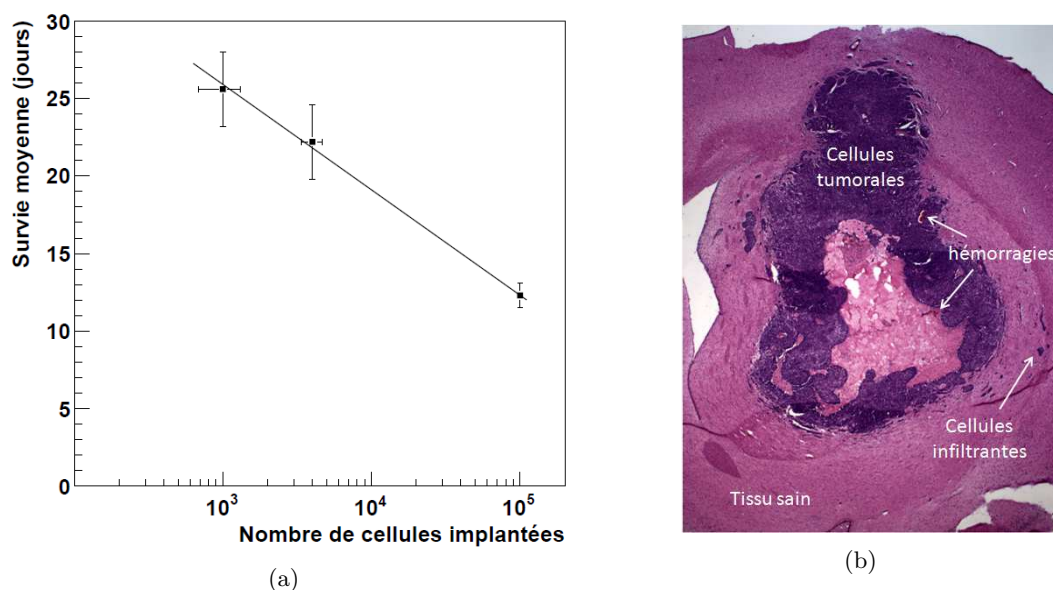


FIGURE 5.2 – (a) Relation entre le nombre de cellules tumorales injectées (n) dans le cerveau des animaux et leur survie moyenne ($S = -2.9\ln(n) + 46.0$ j). (b) Coupe histologique d'un gliome implanté dans le noyau caudé (hémisphère droit) d'un rat. Le gliome s'est développé pendant 19 jours après l'injection de 1000 cellules F98.

A l'inverse d'autres modèles comme les modèles C6 ou 9L, le modèle F98 est faiblement immunogène, ce qui le rend intéressant pour tester l'efficacité d'un traitement anti-tumoral puisqu'il ne déclenche pas de réponse auto-immune qui pourrait le faire régresser de manière spontanée [Bart 09]. L'injection de 100 cellules dans le noyau caudé du rat suffit à entraîner la mort de 100% des animaux.

Des rats porteurs d'un gliome F98 ont été utilisés pour des essais de thérapie et des expériences d'imagerie dans le cadre de ce travail. L'ensemble de ces expérimentations a été approuvé par le comité éthique de l'ESRF. Les protocoles de préparation des animaux sont détaillés plus loin (cf. parties 6.5, p.99 et 9.3.1, p.148).

5.2 Les nanoparticules de gadolinium (GdNPs)

Les nanoparticules de gadolinium (GdNPs) utilisées dans cette étude proviennent du laboratoire de Physico Chimie des Matériaux Luminescents, UMR 5620, Lyon, France. Cette équipe, dirigée par

Olivier Tillement, développe depuis plusieurs années des nanoparticules dédiées aux applications thérapeutiques avec trois objectifs principaux :

- Une longue circulation des NPs dans les fluides corporels pour favoriser une accumulation passive dans les tissus tumoraux par effet EPR (cf. paragraphe 1.2.5, p. 13).
- Une élimination rapide des NPs en circulation, par voies sanguine et rénale (nécessitant une taille de NPs $< 5\text{ nm}$ [Lux 11]).
- Des propriétés de contraste associées à un potentiel thérapeutique.

La synthèse et la caractérisation complète des GdNPs ont été détaillées par *F. Lux* et ses collaborateurs [Lux 11] ainsi que dans le manuscrit de thèse de *I. Miladi* [Mila 12]. Brièvement, ces nanoparticules consistent en un cœur d'oxide de gadolinium entouré d'une couche de polysiloxane. Ces particules primaires ont un diamètre hydrodynamique moyen de $4.5 \pm 0.1\text{ nm}$ (cf. Fig 5.3(a)). Leur structure est ensuite modifiée par la chélation des ions gadolinium de cœur au contact de l'acide diethylenetriamine (DTPA). Cette dissociation du cœur conduit à la formation de petites plateformes de polysiloxane rigides qui possèdent les mêmes propriétés que la structure initiale. Elles portent à leur surface des complexes de Gd-DTPA (60 à 70%) ainsi que du DTPA libre (30 à 40%) qui peut être utilisé pour accrocher d'autres molécules ou atomes (cf. Fig 5.3(b)). Ces particules secondaires ont un diamètre hydrodynamique moyen de $3.0 \pm 0.1\text{ nm}$. Leur poids moléculaire a été évalué par spectrométrie de masse et vaut approximativement $8.5 \pm 1.0\text{ kDa}$. A la fin du processus de synthèse, leur composition chimique correspond à 10 DTPA, 7 Gd et 27 Si par particule [Lux 11]. Enfin, les GdNPs sont fonctionnalisées par une molécule fluorescente (FITC (fluorescein isothiocyanate) dans notre cas) qui permettra de les suivre par microscopie. Les études de *JL Bridot et al.* ont montré leur potentiel pour l'imagerie par résonance magnétique et de fluorescence, ainsi que leur pouvoir radiosensibilisant [Brid 07] [Brid 09].

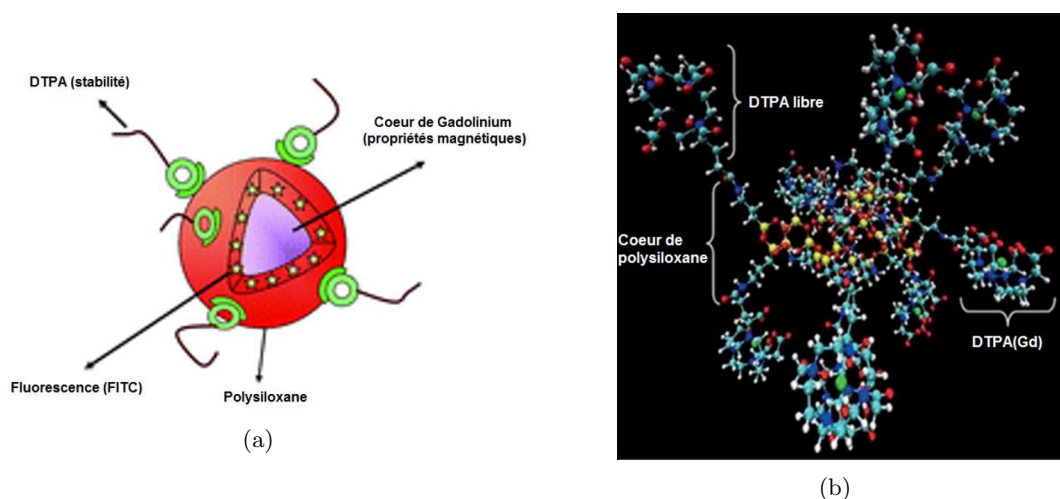


FIGURE 5.3 – (a) Représentation schématique d'une nanoparticule de gadolinium avant dissociation du cœur de Gd ([Brid 09] *graphical abstract*). (b) Représentation d'une GdNP après dissociation du cœur. Les molécules de DTPA chélatent les ions Gd pour former des complexes de Gd-DTPA stables qui sont accrochés sur une plateforme de polysiloxane (Si : jaune, O : rouge, C : bleu clair, N : bleu, Gd : vert, H : blanc). Les molécules de FITC ne sont pas représentées sur cette seconde image, mais sont toujours présentes sur les particules secondaires [Lux 11].

5.3 Les nanoparticules d'or et de platine (AuNPs - PtNPs)

Des nanoparticules d'or et de platine ont également été utilisées pendant cette thèse. Ces NPs proviennent d'une collaboration avec Boris Kysela et Sarah Blair Reid, chercheurs à l'université de Birmingham (UK), qui développent de telles particules essentiellement pour des applications d'imagerie intracellulaire et de transport de composés thérapeutiques. Les études relatives aux AuNPs et PtNPs seront souvent traitées ensemble dans la suite, puisque ces NPs sont synthétisées par le même procédé et fonctionnalisées par deux séquences peptidiques identiques. Leurs seules différences résident en l'élément lourd considéré (Au ou Pt) et en leur taille, 13 et 6 nm pour l'or et le platine respectivement. Les NPs ont été préparées selon les procédures décrites par *Turkevich* et *Grabar* [Turk 86] [Grab 95].

Sur ces NPs, sont ensuite greffées des peptides spécifiques d'un récepteur nucléaire. Deux peptides différents, que nous appellerons *peptide 1* et *peptide 3*, sont accrochés sur chaque type de NPs (Au ou Pt) mettant ainsi à notre disposition quatre types de NPs différents : AuNPs *peptide 1*, AuNPs *peptide 3*, PtNPs *peptide 1* et PtNPs *peptide 3*. La description des peptides n'ayant pas encore été publiée, nos collaborateurs préfèrent ne pas divulguer leur composition pour le moment. Nous ne chercherons donc pas à discuter les différences entre ces deux vectorisations dans ce travail. Cependant, si le ciblage est fonctionnel, les NPs devraient se trouver spécifiquement au niveau des noyaux des cellules après internalisation. Cela représente un point de comparaison intéressant par rapport aux GdNPs décrites plus haut. La figure 5.4 représente de manière schématique les NPs d'or et de platine utilisées. Elles comportent un cœur d'atomes lourds constitué d'environ 875000 *at./NPs* pour l'or et de 86000 *at./NPs* pour le platine. Nous verrons dans la suite le détail de cette estimation et sa validation par des mesures de spectrométrie de masse (cf. paragraphe 7.2.1, page 109).

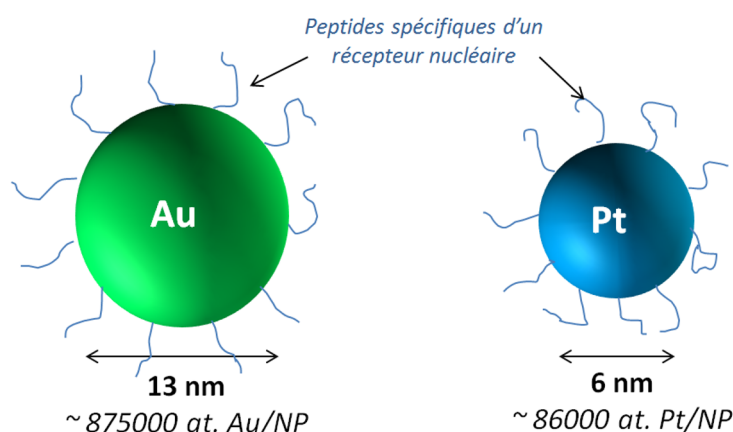


FIGURE 5.4 – Représentation schématique des NPs d'or et de platine fonctionnalisées par des peptides spécifiques d'un récepteur nucléaire.

Chapitre 6

Méthodes expérimentales liées à la toxicité et l'internalisation des NPs

Sommaire

6.1	Analyse des données pour les expériences de biologie	88
6.1.1	Incertitudes de mesures et propagation des erreurs	88
6.1.2	Tests statistiques	88
6.1.3	Ajustement des données	91
6.2	Exposition des cellules F98 aux nanoparticules	92
6.2.1	Culture cellulaire	92
6.2.2	Incubation en présence des nanoparticules	93
6.3	Toxicité des nanoparticules <i>in vitro</i>	93
6.3.1	Survie cellulaire	93
6.3.2	Prolifération cellulaire	94
6.3.3	Cycle cellulaire	94
6.4	Internalisation des nanoparticules par les cellules F98	95
6.4.1	<i>Ion Coupled Plasma - Mass Spectrometry</i>	95
6.4.2	Microscopie à fluorescence	96
6.5	Injection directe des nanoparticules <i>in vivo</i>	99

Ce chapitre présente les différentes méthodes expérimentales utilisées pour évaluer la cytotoxicité des NPs sur les cellules F98 et pour définir la distribution sub-cellulaire des NPs après incubation.

Dans un premier temps, les méthodes d'analyses des données liées aux expériences de biologie seront détaillées afin de préciser les approximations qui seront faites ainsi que la signification des valeurs, graphes et erreurs expérimentales que nous présenterons. Ces méthodes détaillées dans cette première partie s'appliqueront également au reste du manuscrit. Dans un second temps, nous expliquerons les méthodes de mesures clonogéniques, de mesures de la prolifération cellulaire ainsi que de mesures du cycle cellulaire utilisées pour caractériser la cytotoxicité des NPs sur les cellules F98. Enfin, les protocoles de préparation et d'imagerie des cellules par microscopie de fluorescence classique, confocale ou par rayonnement synchrotron seront décrites.

6.1 Analyse des données pour les expériences de biologie

Dans le cadre de ce travail, des études ont été réalisées *in vitro* sur des cultures de cellules (test clonogénique, mesure de la prolifération cellulaire, étude du cycle cellulaire, *etc*) et *in vivo* sur un modèle de gliome implanté chez le rat (survie et imagerie). A chaque fois, s'est posée la question du traitement des données et de leur interprétation. En effet, à l'inverse de la plupart des expériences de physique, les expériences en biologie ne peuvent pas être répétées un grand nombre de fois (expériences longues et matériel disponible souvent peu abondant). De plus, le monde du vivant est complexe et les possibles sources de variations sont nombreuses (influence de la température, de la confluence, du passage des cellules, de la nature du support, *etc*) dans le cas de la culture cellulaire par exemple. Nous nous sommes attachés à analyser les données le plus rigoureusement possible, avec les outils les mieux adaptés aux expériences de biologie. Cette première partie ne vise pas à développer de façon exhaustive la théorie de l'analyse statistique des données, mais nous tâcherons tout de même d'expliquer les méthodes d'analyses que nous avons utilisées, ainsi que les hypothèses et approximations auxquelles elles font appel dans le cadre spécifique des expériences de biologie.

6.1.1 Incertitudes de mesures et propagation des erreurs

L'incertitude (Δm) d'une mesure m permet d'estimer la dispersion possible entre la "vraie valeur" de la grandeur observée et celle mesurée. Nous considérerons toujours le cas le plus courant, d'une incertitude symétrique qui encadre la valeur mesurée $[m - \Delta m; m + \Delta m]$. Δm est une mesure de dispersion qu'on peut considérer comme proportionnelle à l'écart-type σ de l'échantillon, si n est grand (n étant le nombre de mesures composant l'échantillon). Une importante hypothèse sera faite tout au long de ce travail : bien que nous ne pouvons le vérifier expérimentalement en ne répétant que trois fois les expériences, la distribution des échantillons de mesures sera considérée comme normale. En effet, la durée souvent importante des expériences et les faibles quantités de NPs disponibles limitent une plus grande répétition des mesures. Dans ce contexte, l'incertitude sur la moyenne des mesures sera exprimée avec σ , l'écart-type qui caractérise la dispersion des valeurs de l'échantillon autour de \bar{m} (moyenne des mesures) et qui indique 68% de probabilité de trouver la "vraie valeur" dans l'intervalle $\bar{m} \pm \Delta m$.

$$\sigma = \sqrt{v} \quad \text{avec } v, \text{ la variance : } \quad v = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^N (m_i - \bar{m})^2 \quad (6.1)$$

Lorsque la grandeur étudiée n'est pas le résultat direct d'une ou de plusieurs mesures m_i , mais une fonction de ces mesures ($f(m_i)$), son incertitude sera calculée comme une fonction des mesures et de leurs incertitudes respectives (Δm_i). Nous n'utiliserons ici que le cas de variables décorrélées où les incertitudes seront propagées comme suit :

$$\Delta f = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial m_i} \right)^2 \Delta m_i^2} \quad (6.2)$$

6.1.2 Tests statistiques

Il existe de nombreux tests statistiques. Tous visent à vérifier la compatibilité d'un échantillon de données $\{m_i\}_{i=1\dots n}$ avec une loi statistique $f(m)$ entièrement déterminée. Les lois statistiques

usuellement utilisées pour la réalisation de ces tests sont principalement les lois Normale, de Student et du χ^2 . Le premier rôle d'un test statistique est d'établir un jugement de signification statistique, c'est à dire de conclure sur une différence significative (suivant un seuil qu'on s'est fixé) entre deux mesures. Un test statistique n'est en aucun cas suffisant pour établir une relation de cause à effet.

Le t test de Student sera utilisé dans ce travail, car il est le mieux adapté au cas des petits échantillons ($n < 30$). Il peut être utilisé pour comparer un jeu de données à une valeur (fixée) ou à un autre jeu de données. Dans tous les cas, les données doivent suivre une distribution statistique normale, de moyenne \bar{m} et de variance σ^2 . Dans notre cas, la principale application sera la comparaison de moyennes issues d'échantillons différents (survie de cellules contrôles et des cellules traitées, par exemple). Le test t s'appuie sur une hypothèse de départ : l'hypothèse nulle, qui correspond à la position générale établie par défaut, comme par exemple, "*il n'y a pas de différence entre deux traitements testés*". Il s'agit ensuite de déterminer le pourcentage de certitude de cette hypothèse. Cette probabilité est connue sous le nom de p -value. En biologie et dans le domaine de la santé, une probabilité inférieure à 0.05 est souvent considérée comme suffisante pour conclure à une différence significative. Parfois, on choisit un seuil plus faible : 0.01. Dans tous les cas, le choix du seuil doit être défini au préalable et dans ce travail, nous considérerons un seuil de signification à 0.05.

Réalisation du test t : Prenons l'exemple de la comparaison de deux moyennes \bar{m}_c et \bar{m}_t issues de deux distributions normales d'écart-types σ_c et σ_t respectivement (pour "contrôle" et "traitées" par exemple). La figure 6.1 illustre trois situations différentes. Pour chaque situation, les deux distributions comparées ont toujours les mêmes moyennes mais des écart-types différents. Cela implique que des valeurs identiques (en terme de moyennes) peuvent conduire à des conclusions différentes.

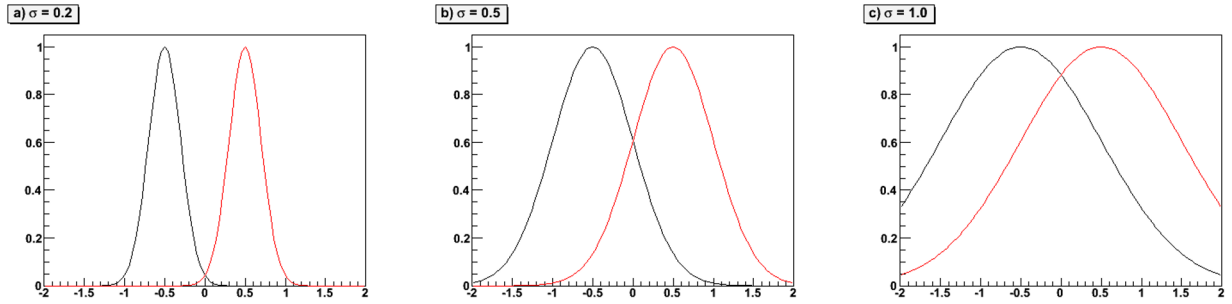


FIGURE 6.1 – Trois cas de figure illustrant l'écart entre deux moyennes.

Connaissant les paramètres \bar{m} et σ des deux distributions, la valeur t associée au test de Student peut être calculée comme suit :

$$t = \frac{\bar{m}_t - \bar{m}_c}{SE(\bar{m}_t - \bar{m}_c)} \quad (6.3)$$

où $SE(\bar{m}_t - \bar{m}_c)$ est appelée erreur standard des différences :

$$SE(\bar{m}_t - \bar{m}_c) = \sqrt{\frac{\sigma_t^2}{n_t} + \frac{\sigma_c^2}{n_c}} \quad (6.4)$$

avec n_i , le nombre de mesures dans l'échantillon i .

La valeur t pourra être positive ou négative (selon si \bar{m}_t est supérieure ou inférieure à \bar{m}_c). Cette valeur de t permet d'accéder à la valeur de p qui, rappelons le, est la probabilité recherchée au départ. Les p – values sont tabulées et dépendent de t et du nombre de degrés de liberté du système¹. La figure 6.2 illustre le rapport entre t et la valeur de p . Dans le cas présenté, si t est compris entre -1.2 et 1.2, alors la p – value est supérieure à 0.05, et l'écart entre les moyennes des distributions ne sera pas considéré significatif. Au delà de ces bornes, l'écart sera considéré significatif (ou "vrai" pour 95% des cas).

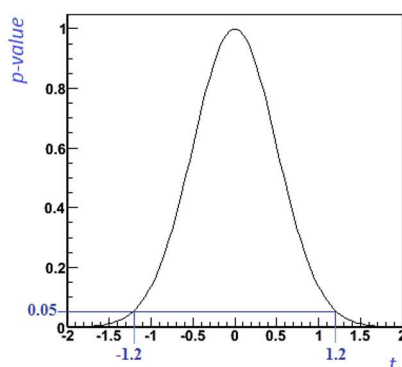


FIGURE 6.2 – Illustration de la relation entre t et la valeur de p

Sous Excel, la fonction à appeler pour comparer deux échantillons avec le test de Student est :

$$=TEST.STUDENT(matrice1;matrice2;uni/bilateral;type) \quad (6.5)$$

Le tableau 6.1 donne la signification des différents paramètres et les valeurs qui seront utilisées pour la comparaison de deux moyennes.

Cumming et ses collaborateurs ont montré la "relation visuelle" qu'il existe entre la p – value et le recouvrement des barres d'erreurs de deux moyennes. La figure 6.3 est extraite de leur publication de 2007. La nature des barres d'erreurs (Erreur Standard (SE), Ecart-type (SD), Intervalle de Confiance (CI) à 68, 95 ou 99%) change la représentation graphique de résultats identiques [Cummm 07]. D'autre part, le recouvrement (ou l'écart) entre les barres d'erreur donne une indication sur la valeur de p . Cette indication dépend du nombre de mesures dans chacun des échantillons. Dans le cas où $n = 3$, un écart équivalent à une barre d'erreur (Erreur Standard) indique une p – value d'environ 0.05. Si les barres d'erreur sont représentées par l'intervalle de confiance à 95% (2σ), alors un recouvrement d'une demi barre d'erreur correspond à la même p – value (environ 0.05). Lorsque n augmente, les interprétations changent. Le cas $n = 10$ est également illustré par la figure 6.3).

1. Le nombre de degrés de liberté d'un système correspond au nombre de mesures composants le système moins le nombre de relations qu'il existe entre ces mesures.

Paramètres	Signification	Choix
<i>matrice1</i>	1 ^{er} échantillon	sélection des n_1 mesures
<i>matrice2</i>	2 ^{ieme} échantillon	sélection des n_2 mesures
<i>uni/bilateral</i>	<i>unilateral</i> (1) : La comparaison n'est réalisée que dans un sens, ($ech_1 \rightarrow ech_2$) ou ($ech_2 \rightarrow ech_1$) <i>bilateral</i> (2) : La comparaison est réalisée dans les deux sens ($ech_1 \leftrightarrow ech_2$)	(2)
<i>type</i>	<i>paired</i> (1) : on compare les mêmes échantillons avant et après un traitement <i>unpaired</i> (2) : on compare deux échantillons différents	(2)

TABLE 6.1 – Signification des paramètres de la fonction *TEST.STUDENT* dans Excel et choix des valeurs pour comparer deux moyennes.

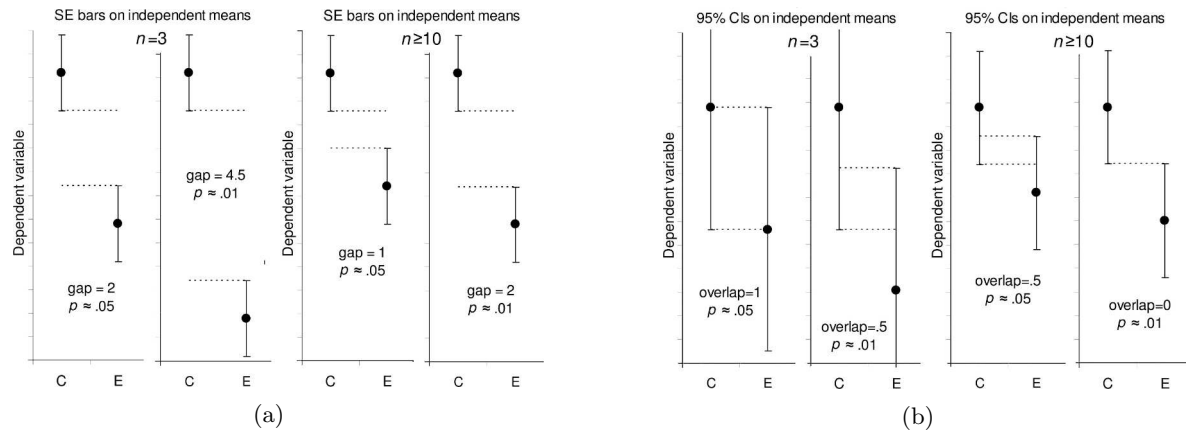


FIGURE 6.3 – Relation entre les p – values et le recouvrement des barres d'erreur en fonction du type de barres d'erreur et du nombre de mesures composant les échantillons (a) $n = 3$, (b) $n = 10$ [Cumm 07].

Les barres d'erreurs affichées dans les graphes de ce document correspondront à un intervalle de confiance de 68% ($\pm 1\sigma$).

6.1.3 Ajustement des données

L'ajustement des données sera utilisé pour caractériser nos échantillons de mesures par un modèle. Les deux méthodes d'ajustement les plus courantes sont l'ajustement par régression et l'ajustement par la méthode des moindres carrés.

Ajustement par régression : L'ajustement par régression ne prend pas en compte les incertitudes de mesures qui peuvent être associées aux différents points expérimentaux y_i . Si on considère une fonction $f(x_i, \vec{\theta})$ qui cherche à minimiser l'écart entre elle même et les points expérimentaux

et qu'on utilise l'écart-type comme mesure de dispersion, alors on cherche à minimiser :

$$\omega(\vec{\theta}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i, \vec{\theta}))^2 \quad (6.6)$$

C'est à dire, à résoudre l'équation :

$$\frac{\partial \omega}{\partial \vec{\theta}} = 0 \text{ où } \left(\frac{\partial}{\partial \vec{\theta}} \right) \text{ condense les dérivées partielles relatives à chaque } \theta_i. \quad (6.7)$$

La qualité de l'ajustement peut être estimée par le calcul du coefficient de régression r^2 , qui estime l'écart résiduel entre les points expérimentaux et l'ajustement après la régression.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - f(x_i, \vec{\theta}))^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (6.8)$$

Un r^2 proche de 1 représente un écart résiduel petit devant la variance de l'échantillon $\{y_i\}$ et par conséquent, un bon ajustement.

Ajustement par la méthode des moindres carrés : Cette méthode est similaire à celle décrite ci-dessus mais elle tient compte de l'incertitude expérimentale associée à chacun des points de l'échantillon. On veut ajuster une loi $y_i = f(x_i, \vec{\theta})$ en donnant un poids plus important aux points ayant une faible incertitude. Il s'agit de minimiser la grandeur :

$$\chi^2(\vec{\theta}) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{y_i - f(x_i, \vec{\theta})}{\Delta y_i} \right)^2 \quad (6.9)$$

La valeur de χ^2 pour laquelle $\frac{\partial \chi^2}{\partial \vec{\theta}} = 0$ permet d'estimer la qualité du fit. $\frac{\chi_{min}^2}{NDL} = 1$ représente un ajustement de très bonne qualité. (NDL , indique le nombre de degrés de liberté du système). De nombreux algorithmes de minimisation numérique existent. Le logiciel *Root*² a été utilisé pour l'ensemble des ajustements présents dans le manuscrit. Dans la mesure du possible, les ajustements seront réalisés par la méthode des moindres carrés.

6.2 Exposition des cellules F98 aux nanoparticules

6.2.1 Culture cellulaire

Les cellules F98 sont cultivées en adhérence dans des flasques en plastique en présence d'un milieu nutritif (5 ou 10 *mL* pour les flasques de 25 ou 75 *cm*² respectivement). Le milieu est composé de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Minimum medium*, Invitrogen, France) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Invitrogen, France) et 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Il sera caractérisé de "milieu complet" dans la suite. Ce milieu est préchauffé à 37°C avant d'être mis au contact des cellules. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide, composée de 95% d'air et de 5% de *CO*₂ et se divisent en mono couche jusqu'à confluence. Elles sont repiquées environ une fois par semaine : Après le retrait du milieu et le rinçage des cellules au PBS 1x (*Phosphate Buffer Saline*, Invitrogen, France), 1 ou 3 *mL* de

2. *Root* est un logiciel d'analyse des données développé par le CERN : <http://root.cern.ch/drupal/>

trypsine³ sont appliqués dans les flasques de 25 ou 75 cm^2 respectivement (Trypsine-EDTA 0.05%, Invitrogen, France). La trypsine agit pendant 5 minutes dans l'étuve puis son action est stoppée par l'ajout de milieu complet (même volume que celui de la trypsine). Les cellules sont centrifugées (5 minutes, 1500 *rpm*) et le culot cellulaire est repris dans du milieu complet afin de réensemencer les cellules à une concentration plus faible (dilution au 10^{ème} généralement).

6.2.2 Incubation en présence des nanoparticules

Les cellules F98 sont mises en culture en plaques multi-puits (afin de minimiser la quantité de NPs nécessaire par expérience) deux jours avant l'exposition aux NPs. Le milieu est ensuite changé et remplacé par du milieu complet contenant des NPs, à la concentration en atomes lourds voulue. Les cellules sont remises à l'étuve. A la fin de la période d'incubation, le milieu est retiré. Les puits sont rincés au PBS 1x et les cellules sont remises en culture ou trypsinées, selon la nature de l'expérience.

6.3 Toxicité des nanoparticules *in vitro*

Dans cette partie, les techniques expérimentales relatives à la mesure de la réponse biologique induite par une simple exposition aux nanoparticules, sont présentées. Certaines expériences ont été conduites avec un seul type de nanoparticules, selon leurs spécificités et les questions posées. Chaque expérience a été répétée au moins 3 fois et pour limiter l'influence des sources d'erreurs, les résultats sont, dans la mesure du possible, comparés à une condition contrôle (même expérience réalisée sur des cellules non exposées aux NPs).

6.3.1 Survie cellulaire

La survie cellulaire a été estimée par test de clonogénicité, qui estime la survie des cellules selon leur capacité à proliférer après un traitement quelconque [Puck 57].

Après l'incubation en présence des NPs, les cellules sont centrifugées et le culot cellulaire est homogénéisé dans du milieu complet (généralement 5 *mL*). Les cellules sont comptées (soit au microscope, après avoir placé 10 μL de la solution dans une cellule de Neubauer, soit au compteur automatique de cellules (CEDEX XS, Roche, France)). La solution est ensuite diluée de sorte à obtenir la quantité de cellules à ensemercer dans un volume variant entre 5 et 500 μL . Ce volume est ensemercé dans trois boîtes de Pétri différentes, de 10 *cm* de diamètre, identifiées et contenant chacune 8 *mL* de milieu complet. Le nombre de cellules à ensemercer est estimé à partir d'expériences préliminaires, de manière à obtenir entre 50 et 150 colonies cellulaires⁴ au final. Pour mesurer la survie après une exposition aux NPs sans irradiation, 3 quantités de cellules différentes sont considérées : 100, 200 et 400 cellules. Le *Plating Efficiency*⁵ (PE) des cellules F98 est de l'ordre de 60 à 70%. Sans traitement particulier, l'ensemencement de 100 cellules permet donc de compter environ 65 colonies après 12 jours d'incubation.

3. La trypsine est une enzyme qui est utilisée en culture cellulaire pour cliver les protéines membranaires d'adhésion des cellules, qui se retrouvent alors en suspension dans le milieu.

4. Une colonie cellulaire consiste en un foyer d'au moins 50 cellules.

5. Le *Plating Efficiency* correspond au pourcentage de survie des cellules sans traitement.

Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve. 11 ou 12 jours après, le milieu de culture est retiré des boîtes, qui sont rincées au PBS 1x. Un mL de Crystal violet⁶ environ (25% crystal violet, 75% éthanol absolu) est ajouté dans chaque boîte et laissé pendant 30 à 60 s . Les boîtes sont ensuite rincées à l'eau et séchées à l'air libre. Enfin, les colonies sont comptées et la survie (S) est calculée comme le rapport entre le nombre de colonies comptées et le nombre de cellules initialement ensemencées :

$$S = \frac{Nb_{colonies}}{Nb_{cellules}} \quad (6.10)$$

6.3.2 Prolifération cellulaire

Après incubation en présence de NPs, les cellules sont rincées, trypsinées puis remises en culture dans 7 puits différents d'une plaque 24 puits (2500 cellules par puits dans 1 mL de milieu complet). Toutes les 24h après la remise en culture, un puits est trypsiné et le nombre de cellules total est mesuré. A la fin de l'expérience, les données sont représentées en fonction du temps après incubation et ajustées par une fonction exponentielle : $a.exp(t/\tau)$. Le paramètre τ donne une information sur la capacité des cellules à proliférer.

6.3.3 Cycle cellulaire

Après incubation avec les NPs, le surnageant est récupéré et stocké dans un Falcon 15 mL . Les cellules sont rincées et trypsinées. L'action de la trypsine est stoppée avec le surnageant mis de côté (de sorte à collecter l'ensemble des cellules, y compris celles qui auraient pu se décoller pendant l'incubation) et la totalité de la solution est centrifugée. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS et la concentration cellulaire est mesurée. Un minimum de 500000 cellules est requis par condition pour ces expériences. Les cellules sont fixées par 1 mL de formalin 2%, ajouté directement dans le Falcon (concentration finale à 1% en formalin). La solution est homogénéisée et stockée 30 minutes à 4°C. Ensuite, sans retirer la formalin, les membranes sont perméabilisées par 2 mL de Triton X-100 à 0.2% dans du PBS (0.1% final dans le tube contenant les cellules). Les cellules sont de nouveau vortexées et remises 30 minutes à 4°C. Enfin, les cellules sont centrifugées, le surnageant est éliminé et les cellules resuspendues dans 500 μL de PBS 1x. 5 μL de DAPI sont ajoutés au tube pour marquer l'ADN (10 minutes à température ambiante). Les cellules sont transférées dans des tubes de cytométrie et l'analyse par cytométrie en flux peut commencer.

Les mesures du cycle cellulaire ont été réalisées en collaboration avec Jean-François Mayol (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France), spécialiste de la cytométrie en flux. L'appareil utilisé est un cytomètre LSR II, BD Bioscience. La détection en fluorescence du DAPI sur 10000 cellules permet de tracer la distribution du cycle cellulaire, *i.e* le pourcentage de cellules dans chaque phase G1, S et G2/M du cycle. Cette mesure est réalisée soit juste après l'incubation avec les nanoparticules, soit 24h après la fin de l'incubation (entre temps, les cellules auront été remises à l'étuve en présence de milieu complet). La figure 6.4 illustre la relation entre intensité de fluorescence détectée et phase du cycle et montre également la segmentation de la phase S en trois sous-phases S1, S2 et S3 que nous avons considérées. L'analyse du cycle cellulaire est réalisée avec le logiciel FlowJo (Tree Star, INC. Ashland, OR) basé sur une méthode de déconvolution des pics.

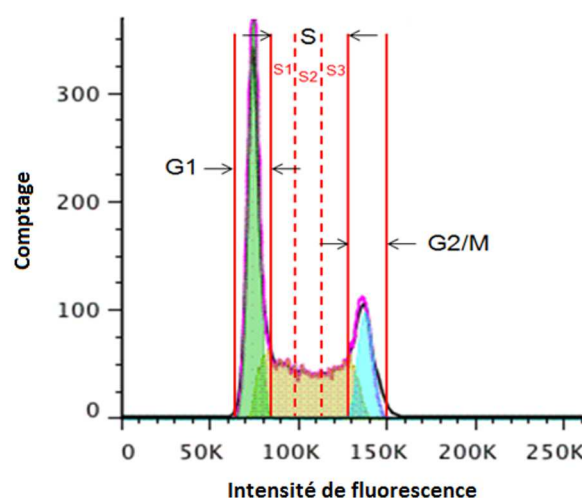


FIGURE 6.4 – Histogramme représentatif du cycle cellulaire d'une population de 10000 cellules. L'intensité de fluorescence, proportionnelle à la quantité d'ADN, indique la phase du cycle dans laquelle se trouve les cellules. L'analyse sépare les cellules dans les 3 principales phases du cycle G1, S et G2/M et dans 3 sous-phases S1, S2 et S3 à l'intérieur de la phase S.

6.4 Internalisation des nanoparticules par les cellules F98

Les nanoparticules sont connues pour être internalisées par les cellules. Afin de comprendre ou d'expliquer au mieux les effets (micro) dosimétriques observés par la suite en combinaison à une irradiation, la localisation sub-cellulaire des NPs et la quantification des concentrations internalisées après incubation, ont été étudiées chez les cellules F98, pour les trois types de NPs (GdNPs, AuNPs et PtNPs). Selon les propriétés des NPs, différentes techniques de microscopie ont été utilisées afin de décrire leurs distributions subcellulaires.

6.4.1 Ion Coupled Plasma - Mass Spectrometry

La concentration de NPs internalisées par les cellules F98 a été estimée par ICP-MS (*Ion Coupled Plasma - Mass Spectrometry*, Thermo X serie II, Thermo Electron, Bremen, Germany). Les cellules sont préparées au laboratoire et les mesures sont effectuées à l'Institut de Biologie et de Pathologie du CHU de Grenoble, dans le cadre d'une collaboration avec Josiane Arnaud. La méthode d'ICP-MS permet de doser des traces d'un ou de plusieurs éléments dans une solution finement divisée (seules les particules inférieures au micron peuvent être analysées aux vues des puissances utilisées pour cette technique). La solution est injectée dans un plasma d'Argon (porté entre 6000 et 8000°C) qui permet d'ioniser les atomes en présence. Les ions sont séparés les uns des autres en fonction de leur rapport masse/charge, par l'application d'un champ électromagnétique

6. Le crystal violet colore les noyaux des cellules.

(puissance de la bobine d'injection : 1200 W). Afin de s'affranchir de la composante isobarique, les propriétés isotopiques des ions sont prises en compte dans l'analyse. Le choix des isotopes mesurés est fonction de leur abondance isotopique naturelle et de l'absence d'interférence isobarique. La sensibilité de la mesure est de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$, ou de la partie par milliard (ppb) en masse. Pour ne pas contaminer les échantillons et rester précis à de telles concentrations, leur préparation est réalisée en salle blanche même si avec les éléments dosés (Gd, Au et Pt), ce problème n'existe pas réellement puisqu'ils sont naturellement peu présents dans notre environnement.

Après incubation en présence des NPs, les surnageants sont récupérés et stockés à 4°C. Les cellules sont rincées (2 fois, PBS 1x), trypsinées, puis centrifugées et resuspendues dans 1 mL de PBS 1x. Le nombre total de cellules est mesuré dans chaque échantillon. Enfin, les cellules sont congelées à -20°C puis transportées au CHU, où la suspension cellulaire est alors dissoute dans de l'acide nitrique (HNO_3 1%) contenant un étalon interne à la concentration de 50 nM. La concentration en atomes lourds est déterminée dans les différents échantillons : solutions mères de NPs ou solutions cellulaires. Une calibration de l'appareil est préalablement réalisée dans la gamme 0-10 $\mu\text{g/L}$. 80 points de mesures sont acquis pour chaque échantillon. La concentration mesurée est normalisée par le nombre total de cellules présentes dans l'échantillon et exprimée en pg/cellule .

6.4.2 Microscopie à fluorescence

Les NPs de gadolinium étant fonctionnalisées par une molécule fluorescente (FITC, *isothiocyanate de fluorescéine*) dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission maximales sont 506 et 529 nm respectivement, elles ont pu être imagées de manière relativement simple *in cellulo* par des techniques de microscopie de fluorescence, classique ou confocale. A l'inverse, les NPs d'or et de platine ne sont pas fonctionnalisées par une telle molécule. D'autres techniques d'imagerie ont été utilisées pour les repérer dans les cellules, comme notamment une technique de micro-fluorescence X développée sur la ligne de lumière ID22 du synchrotron.

6.4.2.1 Microscopie classique

Un microscope équipé de filtres passe-bandes aux longueurs d'ondes adéquates a été utilisé pour localiser les nanoparticules de gadolinium dans les cellules F98 en fonction de la durée d'incubation. Les observations ont été réalisées sur des échantillons de cellules fixées.

Les cellules ont été mises en culture sur des lames dédiées (Labteck 8 puits, 5000 cellules/puits dans 200 μL de milieu complet) trois jours avant l'incubation. La concentration d'incubation est constante pour tous les échantillons : 2.1 mg Gd/mL. Cinq temps d'incubation ont été étudiés : 10 minutes, 30 minutes, 1h, 2h et 5h. Après l'incubation, les cellules ont été rincées au PBS puis fixées avec une solution de PFA 4% (paraformaldéhyde dans du PBS) pendant 15 minutes à température ambiante. Après rinçage au PBS (2x5 min), l'ADN a été marqué à l'aide d'une solution de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole - $\lambda_{exc./em.} = 345/455 \text{ nm}$) à 0.1 $\mu\text{g/mL}$ pendant 10 min à température ambiante. Un dernier rinçage des cellules au PBS a été effectué avant de monter les lames par l'application d'une goutte de Fluoromount G sur l'échantillon et l'apposition d'une lamelle.

Les lames ont été imagées au microscope avec un grossissement $\times 10$. Trois champs de vue au minimum, ont été photographiés par condition. Les temps d'exposition relatifs au DAPI et au FITC valent 50 et 200 *ms* respectivement. Le traitement des images post-acquisition a été effectué avec le logiciel ImageJ (version 1.46).

6.4.2.2 Microscopie confocale

Le microscope confocale de l'IAB (Institut Albert Bonniot de Grenoble, microscope LSM510, Carl Zeiss, Jena, Allemagne), équipé d'un laser Argon de longueur d'onde 488 *nm* et d'une enceinte thermostatée a été utilisé pour imager les cellules F98 pendant leur incubation en présence de NPs de gadolinium. Le taux de CO₂ dans l'enceinte est ajustable et fixé à 5%. Un objectif $\times 40$ à huile a été utilisé pour l'expérience. Les coupes confocales font 1 μm d'épaisseur.

Les cellules ont été mises en culture un jour avant l'expérience dans une chambre Labteck 4 puits (30000 cellules/puits, dans 500 μL de milieu complet). Le jour de l'expérience, le milieu a été retiré des puits et les NPs ont été mises au contact des cellules dans du milieu de culture sans rouge de Phénol (qui induirait un signal fluorescent trop intense), à la concentration de 2.1 *mg Gd/mL*. Les cellules ont été imagées à différents temps après le début de l'incubation, sur une durée totale de 3h30. Les images ont été réalisées à 37°C ou à 4°C. Dans le second cas, l'activité cellulaire est fortement réduite de sorte à ne conserver que les mécanismes passifs d'internalisation. Pour ne pas saturer les images (intensité de fluorescence induite par les NPs présentes dans le milieu d'incubation trop importante), le milieu d'incubation a été retiré au bout d'1h30. Les cellules ont été rincées et remises en présence de milieu de culture sans rouge de Phénol. Le traitement des images post-acquisition a été effectué avec le logiciel ImageJ (version 1.46).

La formation d'agglomérats de NPs a été mesurée par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), sur le même appareil. Cette méthode permet de mesurer le nombre de NPs et leur vitesse de diffusion en fonction de la distance aux cellules, à l'intérieur d'un volume d'analyse de 1 μm^3 [Du 12].

6.4.2.3 Micro-fluorescence *X* par rayonnement synchrotron

Les NPs d'or et de platine n'étant pas directement fonctionnalisées par une molécule fluorescente, nous n'avons pas pu utiliser les techniques de microscopie décrites ci-dessus pour les imager dans les cellules. La méthode d'imagerie sub-micrométrique développée sur la ligne de lumière ID22 de l'ESRF a été utilisée à cet effet. La figure 6.5 représente de manière schématique le set-up expérimental.

La micro-fluorescence *X* utilise un faisceau de rayons *X* monochromatique ($\Delta E/E \approx 10^{-4}$), intense (de l'ordre de 10^{11} *ph/s*) et fortement focalisé (par un système optique utilisant deux miroirs Kirkpatrick Baez (KB), qui est dirigé sur l'échantillon et provoque une émission de photons de fluorescence *X* caractéristique de chaque élément. Un détecteur résolu en énergie est placé sur le côté, avec un angle de 60° par rapport au faisceau incident (cf. Fig. 6.5). Il permet d'acquérir le signal de nombreux éléments : Or et platine notamment, mais aussi zinc, soufre, phosphore, carbone, hydrogène et autres constituants de la matière biologique. La résolution spatiale est fixée

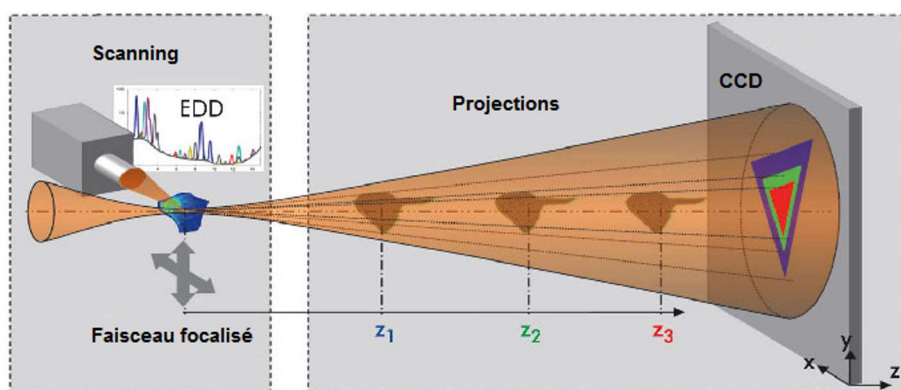


FIGURE 6.5 – Représentation schématique du set-up expérimental de la ligne de lumière ID22. Le faisceau de rayons X focalisé scanne l'échantillon pas à pas. Des détecteurs placés de part et d'autre de l'échantillon collectent le signal de fluorescence caractéristique des éléments contenus dans l'échantillon. Un spectre énergétique est acquis pas à pas et pourra ensuite être intégré dans une région d'intérêt donnée.

à $200 \times 200 \text{ nm}^2$ et le temps d'intégration à 100 ms par point. Le signal est intégré sur toute l'épaisseur de l'échantillon. L'énergie du faisceau, ajustée à 17 keV , permet d'ioniser les atomes d'or et de platine jusqu'à la couche L_1 , dont les seuils énergétiques respectifs valent 14.35 et 13.88 keV . Le spectre de fluorescence X a été analysé avec le logiciel PyMca (*inhouse software*) qui permet de calculer la concentration des éléments à l'intérieur d'un échantillon à partir du spectre de fluorescence X enregistré [Sole 07]. Trois échantillons standards sont également scannés afin d'étalonner le système :

- Un échantillon de foie bovin (Bovin Liver, SRM1577b, national institute of standards and technology, NIST, Gaithersburg, MD).
- Une micro feuille d'or (Au foil, $20.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Goodfellow, Cambridge Ltd.).
- Une micro feuille de platine (Pt foil, $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Goodfellow, Cambridge Ltd.).

Le dispositif expérimental installé sur la ligne de lumière ID22 nécessite de positionner l'échantillon vertical et perpendiculaire au faisceau incident. Les cellules sont donc cultivées sur des membranes de silicium "transparentes" aux RX (membranes de Si_3N_4), de 0.5 cm de côté, adaptées au support expérimental. Une membrane est déposée au fond de chaque puits d'une plaque 24 puits. Les cellules F98 sont ensuite délicatement déposées dans les puits (100000 cellules dans un mL de milieu complet) et placées à l'étuve pour 24h . Le lendemain, les cellules ont adhéré sur la membrane et les NPs sont ajoutées dans le milieu pour 24h supplémentaires d'incubation. A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées au PBS (2 fois) et la moitié des échantillons est fixée par un fixateur chimique tandis que l'autre moitié est fixée par cryofixation. La fixation chimique est plus simple et plus sûre que la cryofixation mais elle est susceptible d'endommager les structures cellulaires entraînant une fuite potentielle des NPs. Dans cette étude, nous réaliserons les deux protocoles pour être sûr d'avoir des échantillons exploitables.

Fixation chimique : Après rinçage des cellules, $200 \mu\text{L}$ d'une solution de glutaraldéhyde (2.5% dans du PBS) sont ajoutés dans les puits pendant 30 min à température ambiante. Les membranes sont ensuite retirées des puits à l'aide d'une pince fine, et passent dans trois bains de rinçage de

PBS (Le PBS est versé dans une boîte de Pétri et la membrane, tenue par la pince, est délicatement plongée dans la solution pendant 4 ou 5 secondes). Le même processus de rinçage est aussitôt répété dans trois bains d'eau ultra pure (afin de retirer un maximum de sels). Enfin, l'excédent de liquide est absorbé sur un tissu et les membranes sont posées sur la tranche dans une plaque 48 puits pour qu'elles sèchent (3h sous le PSM, puis au minimum 24h sous le PSM éteint).

Cryofixation : Un bécher contenant 30 *mL* d'isopentane est placé dans un récipient de polystyrène rempli d'azote liquide pour refroidir la solution à -160° . Les membranes sont rincées de la même manière que pour la fixation chimique : 3 bains de PBS suivis d'un bain d'eau ultra pure. Le surplus de liquide est absorbé sur un tissu puis les membranes sont plongées le plus rapidement possible dans l'isopentane pendant 30 *s*. Elles sont ensuite retirées de la solution et l'excédent de liquide est absorbé par un papier filtre préalablement refroidi à proximité de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite placés dans un dewar. Une fois que l'ensemble des membranes est fixé, elles peuvent être lyophilisées. Pour ça, elles sont délicatement positionnées dans un support en cuivre, lui même refroidi dans l'azote liquide. Le bloc est alors placé dans le lyophilisateur (ID22) et passera une nuit entière à -60° sous vide. Ce processus permet de déshydrater les échantillons. La remontée en température se fait progressivement (au minimum 1h sous vide à température ambiante) pour éviter tout choc thermique et une réhydratation. Les échantillons sont stockés dans un dessiccateur jusqu'à la mesure.

Deux répliques ont été préparés pour chaque protocole de fixation. La durée moyenne d'un scan d'une cellule étant d'1h30, 8 à 10 cellules seront scannées pour chaque condition expérimentale.

6.5 Injection directe des nanoparticules *in vivo*

Afin de vérifier que le modèle animal utilisé au laboratoire (rats Fischer mâles syngéniques, âgés de 7 à 8 semaines et pesant entre 220 et 240 *g* à leur arrivée au laboratoire (*Charles Rivers Laboratoires*, L'Arbresle, Rhône, France) tolère les injections intracérébrales des NPs qui seront nécessaires à la radiothérapie associée aux nanoparticules, un test de toxicité a été réalisé sur des animaux sains.

Les NPs (or et gadolinium) ont été injectées par voie directe dans le cerveau des animaux, par la technique de CED, décrite à la partie 1.2.6, page 13. Les rongeurs ont été anesthésiés par une brève inhalation d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'une solution de Xylazine 25% et de Kétamine 40%, dans de l'eau ppi (0.2 *mL* /100 *g* de rat). Les animaux ont ensuite été positionnés sur un cadre de stéréotaxie à l'aide duquel les coordonnées du point d'injection ont été repérées (3.5 *mm* à droite du bregma⁷ et 5.5 *mm* en profondeur dans le tissu cérébral, par rapport au dessus du crâne). Une petite incision est faite sur le dessus du crâne. Une fois le point d'injection repéré, une fine trépanation est réalisée afin de pouvoir insérer l'aiguille qui permet d'injecter la solution de NPs. Une seringue Hamilton 26sG (1701SN) est utilisée pour l'expérience. 5 et 10 μL des solutions de NPs de gadolinium et d'or respectivement, sont injectés chez des animaux sains. Les concentrations en atomes lourds des solutions valent 22 *mg/mL* et 1.52 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Dans les deux cas, le débit d'injection est fixé à 0.5 $\mu\text{L/min}$. La trépanation est finalement rebouchée à l'aide de cire à os. L'incision est désinfectée et suturée.

7. Le bregma correspond à la jonction des sutures coronale et sagittale des os de la partie supérieure du crâne.

Les animaux sont ensuite surveillés et pesés tous les jours pendant 30 jours après l'injection. Leur comportement est contrôlé afin de détecter des problèmes neurologiques et leur prise de poids est comparée à celle d'un animal contrôle.

Chapitre 7

Réponse des cellules F98 exposées aux nanoparticules

Sommaire

7.1	Exposition des cellules F98 aux nanoparticules de gadolinium	102
7.1.1	Effet sur la survie cellulaire	102
7.1.2	Influence sur la prolifération cellulaire	103
7.1.3	Perturbation du cycle cellulaire	104
7.1.4	Internalisation des GdNPs par les cellules F98	105
7.2	Exposition des cellules F98 aux nanoparticules d'or et de platine . . .	109
7.2.1	Concentration d'incubation	109
7.2.2	Effet sur la survie cellulaire	110
7.2.3	Perturbation du cycle cellulaire	111
7.2.4	Internalisation des Au/Pt NPs par les cellules F98	113
7.3	Toxicité des nanoparticules <i>in vivo</i>	117
7.4	Conclusion	117

Le dernier chapitre de cette partie est consacré à la présentation des résultats obtenus. La toxicité des différentes nanoparticules (gadolinium, or et platine) a été évaluée *in vitro* en termes de survie cellulaire, d'inhibition de la prolifération cellulaire et de perturbation du cycle cellulaire chez les cellules F98. La distribution sub-cellulaire et la quantification des nanoparticules internalisées par les cellules F98 ont également été évaluées *in vitro* par des techniques de microscopie et de spectrométrie de masse. Enfin, une injection par voie directe des NPs (gadolinium et or) dans l'hémisphère droit de rongeurs sains a été réalisée afin de vérifier la tolérance des composés *in vivo*. L'ensemble des résultats sera discuté en conclusion de ce chapitre.

7.1 Exposition des cellules F98 aux nanoparticules de gadolinium

Les nanoparticules de gadolinium (GdNPs) ont été utilisées *in vitro* à des concentrations relativement élevées (de l'ordre du $mg\ Gd/mL$) dans le but d'exploiter l'effet d'augmentation de dose induit par la présence des atomes lourds dans le milieu d'irradiation. Le protocole d'incubation des cellules F98 en présence des GdNPs a donc été ajusté de manière à trouver le meilleur compromis entre une importante quantité de gadolinium adsorbé et une faible toxicité. Les effets cytotoxiques des GdNPs ont été estimés par la mesure de la survie cellulaire, l'étude de la prolifération cellulaire et de la perturbation du cycle cellulaire. Enfin, les mécanismes d'internalisation des GdNPs ont été précisés par microscopie de fluorescence.

7.1.1 Effet sur la survie cellulaire

Différents protocoles d'incubation des cellules F98 en présence de GdNPs ont été testés sur les cellules F98 afin de définir les limites de toxicité, en terme de survie cellulaire. La survie cellulaire a été mesurée par test clonogénique (cf. protocole 6.3.1, page 93), après différentes conditions d'incubation à 37°C, faisant varier les concentrations d'incubation de 0 à 2.1 $mg\ Gd/mL$ et les temps d'incubation de 1 à 24h. Le tableau 7.1 regroupe les valeurs de survies brutes des cellules F98 en fonction de l'incubation.

Concentration	Temps d'incubation			
	Contrôle	1h	6h	24h
0.00 mg/mL	0.69±0.16			
0.53 mg/mL		0.62±0.05	0.58±0.05	0.57±0.19
1.05 mg/mL		0.71±0.02	0.78±0.12	0.74±0.17
2.10 mg/mL		0.62±0.11	0.60±0.14	0.23±0.03

TABLE 7.1 – Survies moyennes \pm SD des cellules F98 exposées à différentes concentrations de GdNPs, pour différents temps d'incubation. La condition 24h en présence de 2.10 mg/mL de Gd entraîne une diminution significative de la survie cellulaire par rapport au contrôle ($p=0.001$).

Seul le protocole d'incubation le plus important (24h associées à une concentration initiale de 2.1 mg/mL de Gd) entraîne une diminution significative de la survie cellulaire ($p=0.001$). Les autres protocoles d'incubation testés ne modifient pas la survie de manière significative par rapport aux cellules contrôles ($p>0.05$).

Un seul protocole d'incubation a été retenu pour la suite des expériences. Il correspond à un compromis entre quantité de GdNPs adsorbées importante, faible toxicité et temps d'incubation adapté aux contraintes expérimentales. Ce protocole a été fixé à une incubation de 5h en présence de 2.1 $mg\ Gd/mL$ à 37°C. La survie des cellules F98 suite à une telle incubation a été estimée à partir de quatre expériences indépendantes, répétées chacune en triplicata. Le tableau 7.2 compare les survies des cellules exposées, aux survies des cellules contrôles.

L'ensemble des données permet de vérifier que le protocole d'incubation choisi *in vitro* ne conduit

Condition	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
S_ϕ (Cellules ϕ)	0.64±0.07	0.59±0.04	0.56±0.07	0.66±0.08
S_{GdNPs} (Cellules+GdNPs)	0.65±0.12	0.50±0.05	0.61±0.07	0.59±0.06
$\frac{S_{GdNPs}}{S_\phi}$ (Survie normalisée)	1.02±0.22	0.85±0.10	1.09±0.18	0.89±0.14
\bar{S} (Survie normalisée moyenne)	0.96±0.11			

TABLE 7.2 – Survies moyennes brutes et normalisées \pm SD des cellules F98 exposées à 2.1 mg/mL de Gd, pendant 5h d’incubation à 37°C, pour quatre expériences indépendantes.

pas à une diminution significative de la survie des cellules F98.

7.1.2 Influence sur la prolifération cellulaire

Bien que le protocole d’incubation choisi n’ait pas d’influence sur la survie des cellules F98, une perturbation de leur métabolisme a été observée. L’incubation induit un arrêt de la prolifération qui est temporaire et réversible environ trois jours après la fin de l’incubation. Les graphes 7.1(a), 7.1(b) et 7.1(c) représentent la croissance cellulaire entre les jours 1 et 3, 3 et 5 et 5 et 7 après l’incubation respectivement.

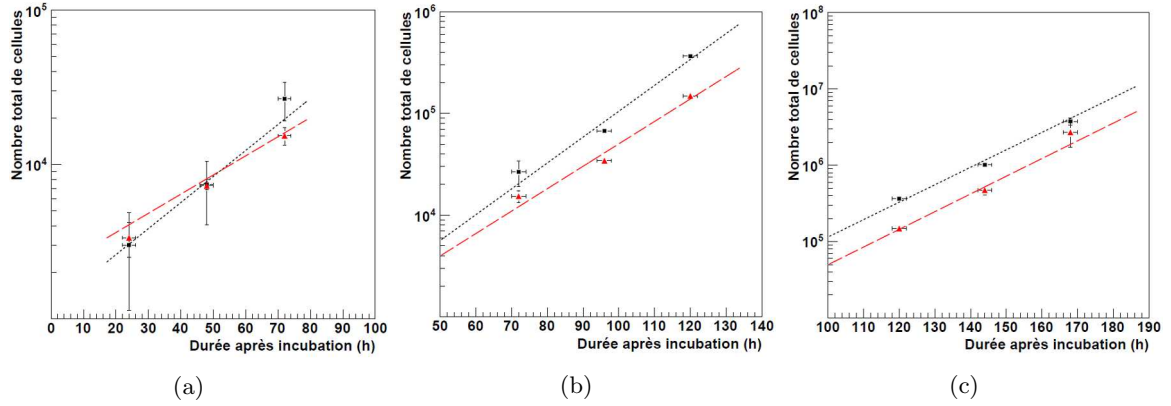


FIGURE 7.1 – Prolifération des cellules contrôles (noir) et exposées aux GdNPs (2.1 mg/mL, 5h) (rouge), (a) entre les jours 1 et 3, (b) 3 et 5 et (c) 5 et 7 après l’incubation. Les données sont ajustées par une fonction exponentielle $a.exp(t/\tau)$ dont les paramètres sont donnés dans le tableau 7.3.

Les données sont ajustées par la fonction $a.exp(t/\tau)$ dont les paramètres sont regroupés dans le tableau 7.3. τ , exprimé en heures, donne une indication sur la prolifération des cellules au cours du temps. Ne considérant que la condition contrôle (noir), on remarque que les cellules ont une croissance plus lente au temps précoce ($\tau = 25.7 \pm 1.4h$ entre le 1^{er} au 3^{ieme} jour), qu’aux temps tardifs ($\tau = 19.0 \pm 0.5h$ entre le 5^{ieme} au 7^{ieme} jour). Cela est dû au fait que les cellules sont trypsinées puis remises en culture après l’incubation. Elles se multiplient à nouveau, seulement après qu’elles aient adhéré au support (*i.e* quelques heures après la mise en culture). D’autre part, la prolifération

est ralentie sur la dernière période par rapport à la période intermédiaire ($\tau = 19.0 \pm 0.5\text{h}$ entre J5 et J7, contre $17.1 \pm 0.2\text{h}$ entre J3 et J5). L'augmentation de la confluence dans les puits aux temps tardifs peut expliquer le ralentissement de la prolifération cellulaire.

Condition	J1-J3		J3-J5		J5-J7	
	τ (h)	χ^2	τ (h)	χ^2	τ (h)	χ^2
ϕ	25.7 ± 1.4	1.0	17.1 ± 0.2	3.2	19.0 ± 0.5	2.5
GdNPs	35.0 ± 4.5	0.8	19.7 ± 1.6	4.6	18.7 ± 2.7	1.1

TABLE 7.3 – Paramètres d'ajustement de la prolifération cellulaire par la fonction $a.exp(t/\tau)$ pour cellules contrôle (ϕ) et exposées aux GdNPs.

La prolifération des cellules exposées aux GdNPs est plus lente que celle des cellules contrôles sur la première période de temps considérée : $35.0 \pm 4.5\text{h}$ pour les cellules exposées contre $25.7 \pm 1.4\text{h}$ pour la condition contrôle. Cette inhibition de la prolifération s'atténue sur la période de temps intermédiaire (entre les jours 3 et 5 après incubation) avec des constantes qui valent $17.1 \pm 0.2\text{h}$ et $19.7 \pm 1.6\text{h}$ pour les cellules contrôles et exposées aux GdNPs, respectivement. Enfin, les cellules exposées aux GdNPs retrouvent une capacité à proliférer identique à celles des cellules contrôles, sur la période allant du 5^{ème} au 7^{ème} jour après exposition : $\tau_\phi = 19.0 \pm 0.5\text{h}$ et $\tau_{GdNPs} = 18.7 \pm 2.7\text{h}$.

7.1.3 Perturbation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire des cellules exposées aux GdNPs a été mesuré par cytométrie en flux, juste après l'incubation et 24h après celle-ci. La figure 7.2 présentent les pourcentages des cellules dans les différentes phases du cycle : G1, S et G2/M et dans les sous-phases S1, S2 et S3, pour les cellules contrôles (noir) et les cellules exposées aux GdNPs (rouge), pour les deux temps de fixation des cellules. Les méthodes expérimentales et d'analyses sont décrites au paragraphe 6.3.3, page 94.

Juste après l'incubation, la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle ne change pas de manière significative par rapport aux cellules contrôles ($p > 0.05$ pour toutes les phases) (cf. Fig. 7.2(a)). On observe seulement un décalage à l'intérieur de la phase S avec une diminution de $32 \pm 12\%$ de la fraction de cellules en S1 et une augmentation de $10 \pm 2\%$ et de $19 \pm 17\%$ des fractions de cellules en S2 et S3 respectivement (cf. Fig. 7.2(b)).

Lorsque les cellules sont fixées 24h après la fin de l'incubation (cf. Fig. 7.2(c) et 7.2(d)), elles ont eu le temps d'entamer un nouveau cycle de division. On observe alors des effets plus marqués avec une forte accumulation des cellules en G2/M ($57 \pm 28\%$) et une diminution du nombre de cellules en phase S ($-18 \pm 10\%$) : $p = 0.02$ et $p = 0.05$ par rapport aux cellules contrôles, respectivement. Cette modification du cycle cellulaire semble corrélée à l'arrêt de la prolifération mesuré plus haut puisque la division cellulaire ne peut pas se faire tant que les cellules sont bloquées en G2/M.

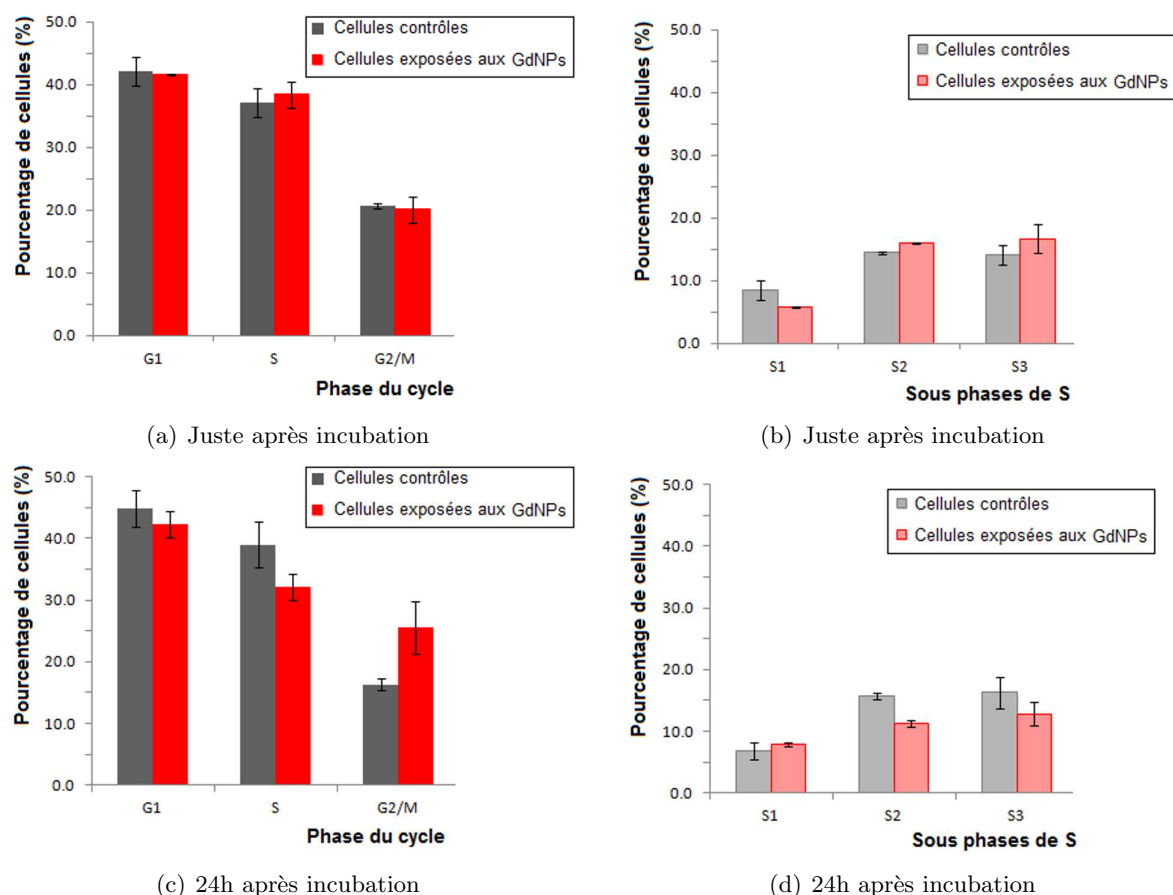


FIGURE 7.2 – Pourcentage des cellules dans les différentes phases du cycle : G1, S et G2/M et sous phases de la phase S : S1, S2 et S3 (a) et (b), lorsque les cellules sont fixées juste après incubation et (c) et (d) lorsque les cellules sont fixées 24h après la fin de l'incubation.

7.1.4 Internalisation des GdNPs par les cellules F98

L'internalisation des NPs par les cellules est un phénomène courant et largement décrit dans la littérature [Cant 12] [Chit 10b]. Le mécanisme le plus souvent observé est l'endocytose, mais ce phénomène semble moins adapté aux nanoparticules ultra-fines comme le sont les GdNPs étudiées ici. Dans le cas des NPs de petite taille ($< 5 \text{ nm}$), d'autres mécanismes entrent en jeu et *W. Rima* montre par exemple que la macropinocytose devient possible chez des cellules SQ20B, sous réserve que les NPs se regroupent en agrégats à proximité des membranes cellulaires [Rima 13]. La distribution sub-cellulaire des GdNPs est un point essentiel que l'on souhaite caractériser pour interpréter par la suite, la réponse des cellules à une irradiation X en présence de GdNPs. En effet, la microdosimétrie associée à une telle irradiation est directement corrélée à la localisation des NPs par rapport aux cellules (cf. chapitre 8, p.125).

7.1.4.1 Cinétique d'internalisation

La cinétique d'internalisation des GdNPs a été observée par microscopie de fluorescence, sur des cellules rincées et fixées après différentes durées d'incubation. L'image 7.3 représente l'accumulation des GdNPs dans les cellules, au cours du temps (FITC, en vert). Les noyaux des cellules, marqués au DAPI, apparaissent en bleu. Dès 10 minutes d'incubation, un faible signal fluorescent attribué aux GdNPs est détecté (cf. Fig. 7.3(a)). L'intensité de ce signal augmente ensuite avec le temps d'incubation et après 5h, la grande majorité des cellules a adsorbé des GdNPs. Les NPs ne semblent pas être dans les noyaux, mais seule une technique d'imagerie confocale pourra préciser leur localisation.

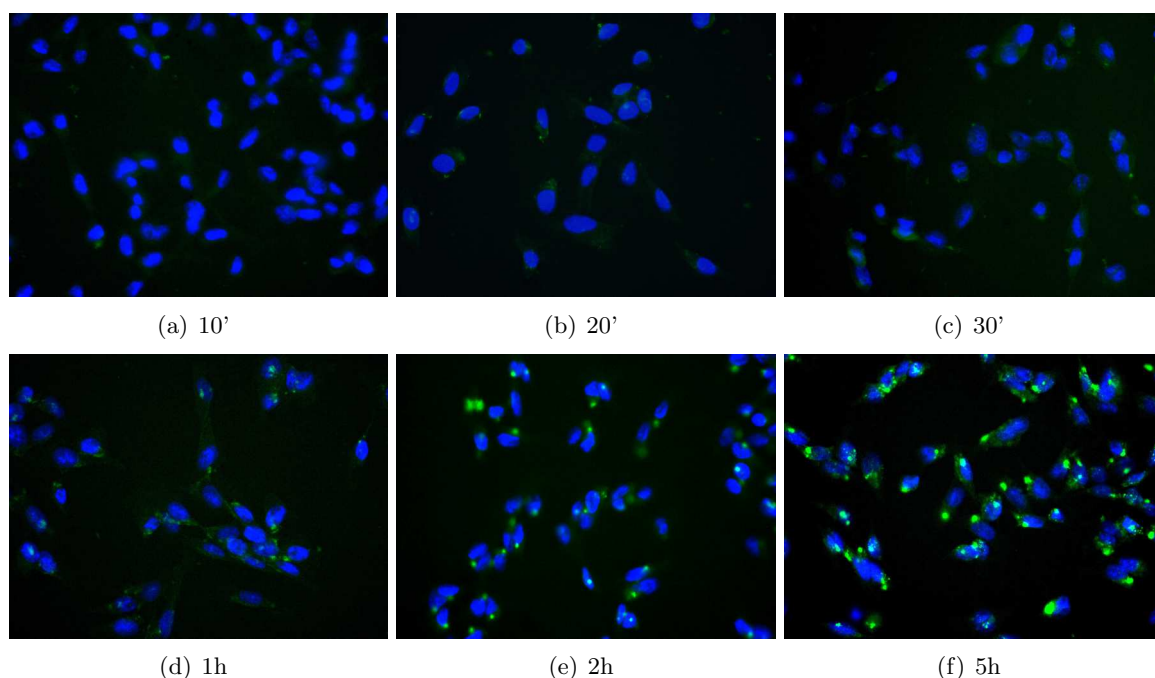


FIGURE 7.3 – Cellules F98 fixées après (a) 10 minutes, (b) 20 minutes, (c) 30 minutes, (d) 1h, (e) 2h et (f) 5h d'incubation en présence de 2.1 mg/mL de GdNPs. Les noyaux marqués au DAPI apparaissent en bleu. Les GdNPs fonctionnalisées au FITC apparaissent en vert. Grossissement $\times 10$.

La concentration de gadolinium adsorbée par les cellules a été quantifiée par ICP-MS. Les données sont en accord avec les images puisqu'elles montrent une accumulation croissante avec la durée d'incubation, jusqu'à un maximum de $0.60 \pm 0.05 \text{ pg Gd/mL}$ après 5h d'incubation. Cette concentration ne croît pas linéairement avec le temps mais tend vers un plateau au delà de 5h (cf. Fig. 7.4).

Cette concentration peut être convertie en nombre de NPs adsorbées puisque chaque GdNP contient environ 7 atomes de gadolinium [Lux 11]. Cela permet d'estimer le nombre moyen de NPs

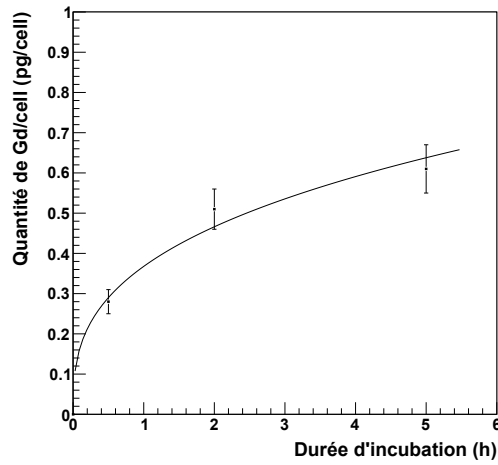


FIGURE 7.4 – Cinétique d’adsorption des GdNPs par les cellules F98, mesurée par ICP-MS.

adsorbées par une cellule F98 à $3.3 \cdot 10^8$ GdNPs/cell.

7.1.4.2 Distribution sub-cellulaire des GdNPs

Des expériences de microscopie confocale ont été réalisées sur des cellules F98 en culture, non fixées (le microscope est équipé d’une enceinte thermostatée - cf. 6.4.2.2, p. 97), afin de préciser la distribution subcellulaire des GdNPs. Pour ne pas saturer les images, le surnageant contenant les GdNPs en suspension a été retiré au bout de 1h30 d’incubation et du milieu de culture sans rouge de Phénol a été remis sur les cellules. Les images 7.5 montrent la distribution des GdNPs à différents temps après le début de l’exposition des cellules aux GdNPs.

Les GdNPs semblent se localiser préférentiellement sur les membranes cellulaires, sans être directement internalisées à l’intérieur du cytoplasme. On utilisera le terme d’adsorption pour décrire cette localisation préférentielle dans la suite. L’image à 4h47 (*i.e.* environ 3h après que les GdNPs aient été retirées du milieu d’incubation) montre qu’une partie des GdNPs reste adsorbée sur les membranes des cellules plusieurs heures après le rinçage. Certaines doivent cependant s’être détachées car le niveau d’intensité de fluorescence du milieu augmente par rapport aux images plus précoces et les foyers fluorescents sont moins gros et moins nombreux sur les membranes des cellules (observations sur environ 10 cellules) (cf. Fig 7.5(d)).

Des mesures complémentaires par spectroscopie de corrélation de fluorescence ont permis de confirmer que les GdNPs ne formaient pas d’agrégats entre elles dans le milieu de culture à distance des cellules. Cette observation pourrait expliquer le fait qu’elles ne soient pas internalisées par endocytose puisque ce mécanisme d’internalisation concerne essentiellement les particules massives (supérieure à 10 nm) ou les NPs plus petites mais qui se regroupent en agrégats à proximité des membranes [Rima 13].

Lorsque cette même expérience d’imagerie confocale est réalisée à 4°C, le métabolisme des

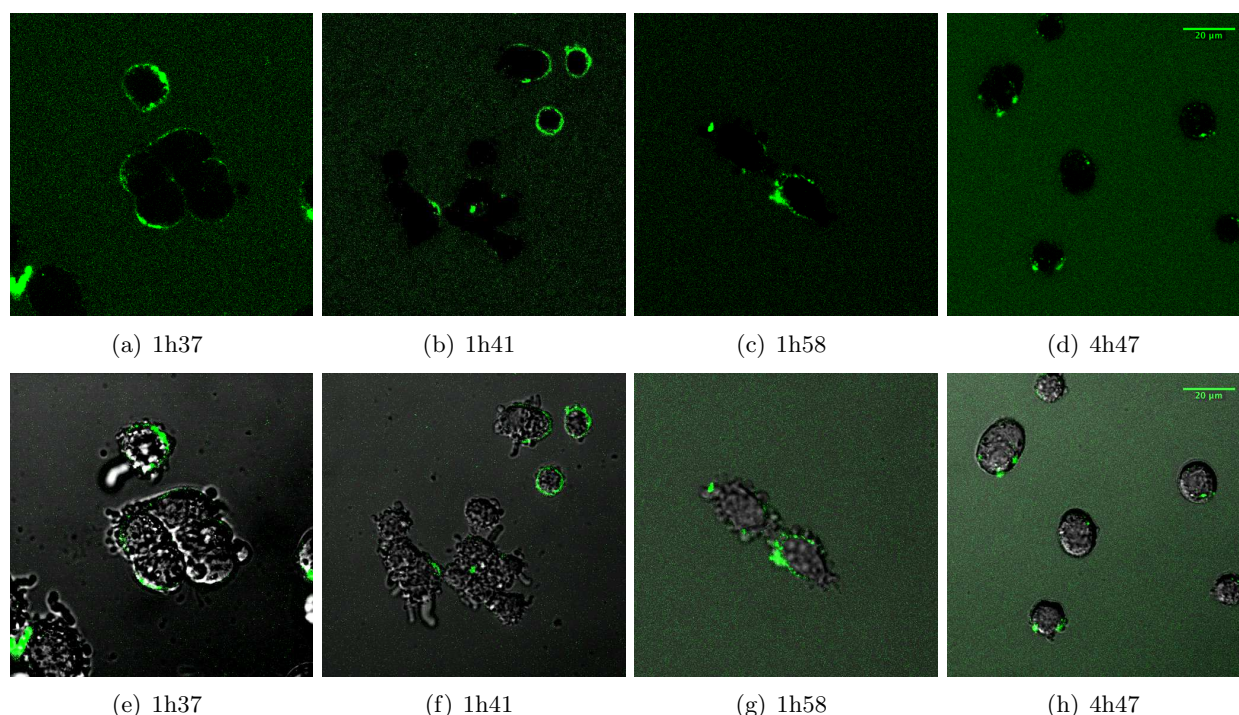


FIGURE 7.5 – Cellules F98 imagées par microscopie confocale ($\times 40$) (a) 1h37, (b) 1h41, (c) 1h58 et (d) 4h47 après le début de l'incubation. Les GdNPs ont été retirées du milieu 1h30 après le début de l'incubation. Les images (e), (f), (g) et (h) représentent la superposition des images en fluorescence et des images des cellules (contraste de phase) des conditions (a), (b), (c) et (d) respectivement.

cellules est fortement ralenti, de sorte que les mécanismes actifs n'interviennent plus. L'image 7.6 représente le signal fluorescent mesuré après 2h d'incubation (NPs retirées du milieu d'incubation au bout d'1h30) dans deux volumes d'intérêt.

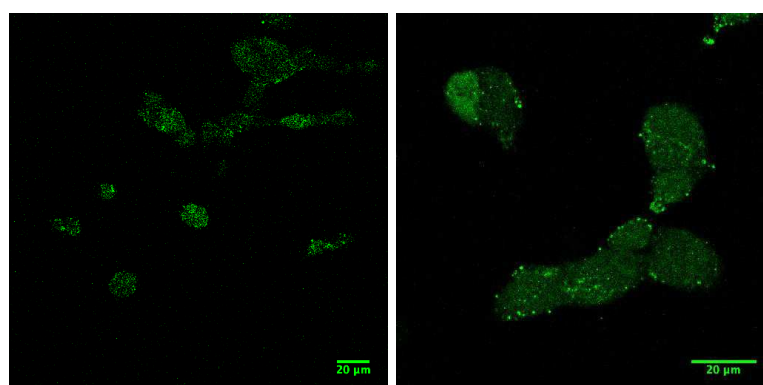


FIGURE 7.6 – Cellules F98 imagées en microscopie confocale à 4°C , 2h après le début de l'incubation. Les GdNPs ont été retirées du milieu 1h30 après le début de l'incubation.

Les NPs peuvent également être internalisées à 4°C et dans ce cas, elles se distribuent de manière assez homogène à l'intérieur du cytoplasme des cellules, ce qui est très différent de la localisation préférentielle mise en évidence à 37°C. Leur petite taille (3 nm) leur permet d'être internalisées par voie passive (*i.e* par simple diffusion mécanique à travers les pores membranaires). Ce mécanisme se produit aussi à 37°C puisqu'il ne dépend pas de la température [Rima 13]. Les GdNPs internalisées de cette manière ne sont pourtant pas visibles sur les images acquises à 37°C puisque leur signal fluorescent est minoritaire par rapport à celui des GdNPs adsorbées sur les membranes. La quantité de GdNPs disponibles étant insuffisante à ce moment du projet, les concentrations intracellulaires de Gd obtenues par diffusion passive n'ont pas pu être quantifiées par ICP-MS.

7.2 Exposition des cellules F98 aux nanoparticules d'or et de platine

Des NPs d'or (13 nm) et de platine (6 nm) ont également été étudiées dans ce projet. Elles sont fonctionnalisées pour cibler les membranes nucléaires des cellules. Deux peptides différents, que nous appellerons *peptide 1* et *peptide 3*, ont été testés à la fois avec les AuNPs et les PtNPs. Une description plus complète des NPs a été donnée en introduction de cette partie (cf. 5.2, p.83), mais la composition des peptides n'ayant pas été communiquée, la discussion entre ces deux fonctionnalisations ne sera pas approfondie ici.

7.2.1 Concentration d'incubation

Afin d'homogénéiser les protocoles expérimentaux avec ceux de nos collaborateurs, les temps et concentrations d'incubation des NPs ont été définis en accord avec les expériences préliminaires réalisées par Sarah Blair-Reid (post-doctorante dans l'équipe en question). Une concentration de 2.8 nM (en moles de NPs) est retenue. Cette concentration correspond à $1.6 \cdot 10^{12}$ NPs/mL de milieu d'incubation. En considérant que les NPs d'or et de platine sont des billes remplies d'atomes, de 13 et 6 nm de diamètre respectivement, nous pouvons estimer le nombre d'atomes lourds qu'elles comportent. Le rayon de covalence d'un atome d'or est équivalent à celui d'un atome de platine et vaut 1.36 Å. Le volume d'un atome vaut $1.05 \cdot 10^{-29}$ m³. Une nanoparticule d'or comporte donc environ 873400 atomes d'or et une nanoparticule de platine, 85869 atomes de platine. La concentration d'incubation peut être convertie en mg/mL :

$$C(\text{mg/mL}) = C(\text{NPs/mL}) \times (\text{Nb.atomes/NP}) \times \frac{A(\text{g.mol}^{-1})}{N_A} \quad (7.1)$$

avec A , le nombre de masse de l'élément considéré (195 g.mol⁻¹ pour le platine et 197 g.mol⁻¹ pour l'or), et N_A , le nombre d'Avogadro ($6.02 \cdot 10^{23}$ at.mol⁻¹).

Les concentrations d'incubation exprimées en atomes lourds, sont estimées à $4.57 \cdot 10^{-1}$ et $4.45 \cdot 10^{-2}$ mg/mL pour les AuNPs et PtNPs respectivement. Ces concentrations d'incubation ont été mesurées par ICP-MS (cf. Tab. 7.4). L'estimation de l'assemblage des atomes selon une sphère est assez bonne puisque les valeurs mesurées sont du même ordre de grandeur que les valeurs calculées.

NPs	Diamètre (nm)	Atomes/NPs (Au ou Pt)	Concentration en Au ou Pt estimée (mg/mL)	Concentration en Au ou Pt mesurée (mg/mL)
AuNPs	13 nm	873400	$4.57.10^{-1}$	peptide 1 : $4.6.10^{-1} \pm 2.10^{-2}$ peptide 3 : $2.1.10^{-1} \pm 1.10^{-2}$
PtNPs	6 nm	85869	$4.45.10^{-2}$	peptide 1 : $8.67.10^{-3} \pm 5.10^{-5}$ peptide 3 : $9.16.10^{-3} \pm 1.2.10^{-4}$

TABLE 7.4 – Estimation du nombre d’atomes lourds contenu par NP et de la concentration d’incubation (exprimée en *mg* d’atomes lourds /*mL*) correspondante. Comparaison des concentrations estimées aux concentrations mesurées par ICP-MS.

7.2.2 Effet sur la survie cellulaire

La toxicité induite par une exposition aux différentes NPs a été mesurée par test clonogénique sur les cellules F98, pour deux concentrations de NPs différentes : 1.4 et 2.8 *nM*. La figure 7.7 présente les résultats. Le temps d’incubation a été fixé à 24h.

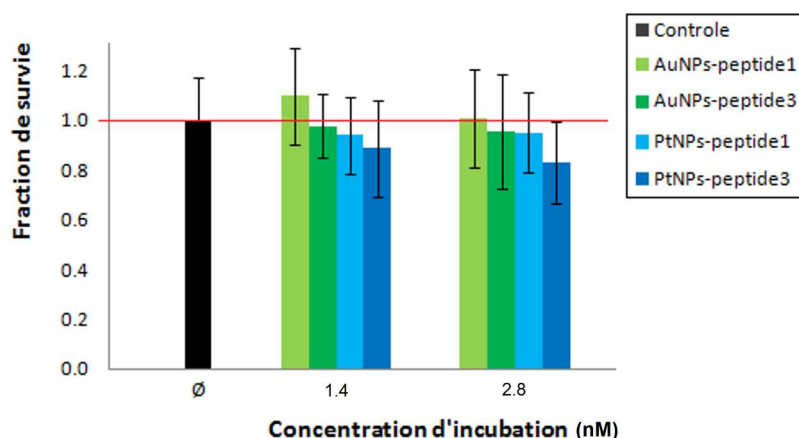


FIGURE 7.7 – Survie normalisée des cellules F98 après une exposition de 24h à 37°C, à 1.4 ou 2.8 *nM* de Au ou PtNPs fonctionnalisées par les *peptides* 1 ou 3.

Bien que l’exposition aux PtNPs *peptide* 3 (n’importe quelle concentration) présente le plus faible taux de survie, aucune des incubations testées ne diminue significativement la survie des cellules F98 après 24h d’exposition à 1.4 ou 2.8 *nM* de NPs ($p > 0.05$ quelque soit la condition). Dans la suite des expériences, la plus forte concentration d’incubation sera donc conservée, *i.e* 2.8 *nM* de NPs ou $4.57.10^{-1}$ et $4.45.10^{-2}$ *mg/mL* d’atomes lourds pour les AuNPs et PtNPs respectivement.

7.2.3 Perturbation du cycle cellulaire

De la même manière que pour les GdNPs, le cycle cellulaire a été mesuré par cytométrie en flux, soit juste après la fin de l'incubation (*i.e* 24h après le début de l'incubation), soit 24h après (*i.e* 48h après le début de l'incubation). Les graphes 7.8 et 7.9 présentent les résultats sous forme des pourcentages de cellules exprimés pour chaque phase du cycle cellulaire, pour chaque type de NPs et pour les deux temps de fixation étudiés.

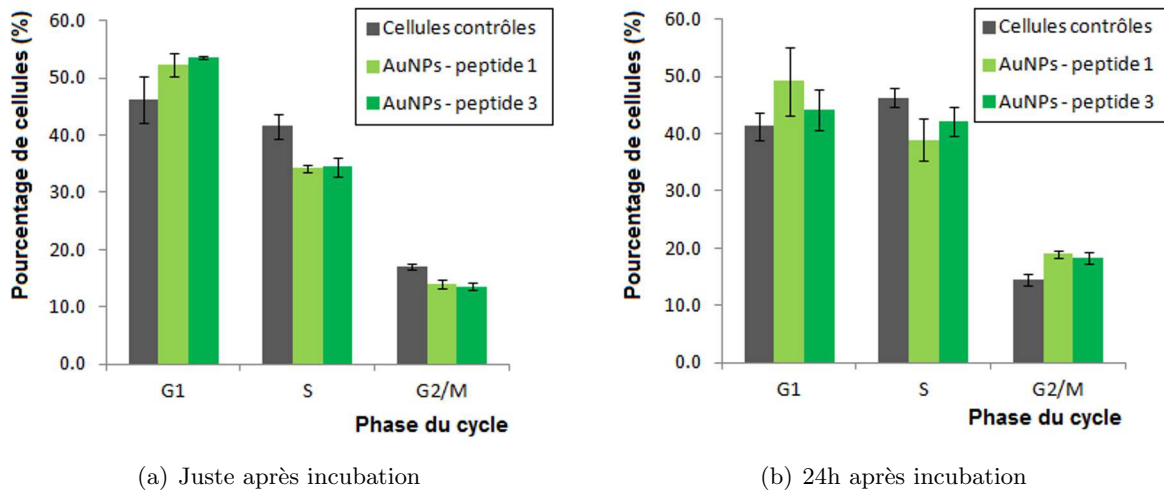


FIGURE 7.8 – Pourcentages des cellules F98 exposées pendant 24h aux AuNPs *peptide 1* (vert clair) ou *3* (vert foncé), dans chaque phase du cycle cellulaire G1, S et G2/M : (a) juste après incubation et (b) 24h après la fin de l'incubation.

AuNPs : Les nanoparticules d'or influencent la distribution des cellules dans le cycle cellulaire. Juste après l'incubation, on observe, par rapport aux cellules contrôles, une diminution du pourcentage de cellules dans les phases S ($-17.7 \pm 4.5\%$ et $-17.1 \pm 5.9\%$ pour les *peptides 1* et *3* respectivement ($p = 0.02$ et 0.03)) et G2/M ($-18.1 \pm 5.2\%$ et $-20.2 \pm 4.8\%$ pour les *peptides 1* et *3* respectivement ($p = 0.01$ pour les deux peptides)). On remarque que ces diminutions en S et G2/M sont compensées par une augmentation du pourcentage des cellules en G1 qui n'est cependant pas significative du fait de la plus grande dispersion des mesures entre les répliques ($p = 0.16$ et 0.10 pour les peptides 1 et 3 respectivement) (cf. Fig. 7.8(a)).

24h après la fin de l'exposition (cf. Fig. 7.8(b)), on observe une accumulation des cellules en G2/M ($+31.4 \pm 10.5\%$ et $+26.2 \pm 12.1\%$ pour les *peptides 1* et *3* respectivement) qui est significative par rapport aux mesures relatives aux cellules contrôles ($p = 0.01$ pour le *peptide 1* et 0.03 pour le *peptide 3*). On observe une légère augmentation du pourcentage de cellules en G1 et une diminution des cellules en S, mais ces différences ne sont pas significatives.

Enfin, on remarque que la fonctionnalisation par les *peptides 1* ou *3* ne fait aucune différence importante dans la distribution du cycle cellulaire.

PtNPs : A l'inverse des AuNPs, les PtNPs n'influencent pas de manière significative le cycle

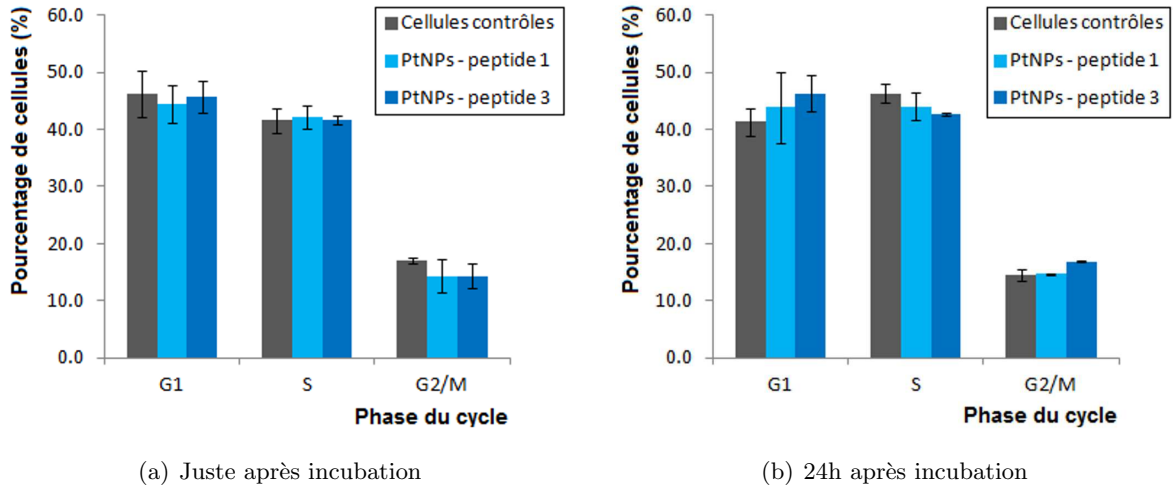


FIGURE 7.9 – Pourcentages des cellules F98 exposées pendant 24h aux PtNPs *peptide 1* (bleu clair) ou *3* (bleu foncé), dans chaque phase du cycle cellulaire G1, S et G2/M : (a) juste après incubation et (b) 24h après la fin de l'incubation.

cellulaire des cellules F98, que ce soit juste après l'incubation ou 24h après ($p > 0.05$ quelque soit la condition expérimentale). Juste après l'incubation, on observe une légère diminution des cellules en G2/M : $-16.0 \pm 17.6\%$ et $-15.8 \pm 13.1\%$ pour les *peptides 1* et *3* respectivement ($p = 0.19$ et 0.11 pour les *peptides 1* et *3*) (cf. Fig. 7.9(a)). 24h après la fin de l'incubation, on observe une accumulation en G1 et en G2/M pour le *peptide 3* : $+12.1 \pm 10.3\%$ en G1 ($p = 0.14$) et $+16.2 \pm 8.5\%$ en G2/M ($p = 0.06$) (cf. Fig. 7.9(b)).

Les différences observées sont cependant à considérer avec prudence car le faible nombre de réplicas expérimentaux influence le calcul des p -values. En effet, du fait de la faible quantité de NPs disponible au départ, seulement deux réplicas ont pu être effectués pour les conditions positives (en présence de NPs) de cette série d'expériences.

En parallèle de cette expérience, la prolifération cellulaire a été mesurée pour chaque condition, sur une période de temps de 48h, à partir du début de l'incubation. Il a été observé que les nanoparticules d'or ne modifiaient pas la prolifération des cellules. Le temps de doublement a été estimé à 17.6 ± 4.8 h et 18.4 ± 1.7 h pour les *peptides 1* et *3* respectivement, ce qui n'est significativement différent de la prolifération des cellules contrôles : $\tau_\phi = 17.2 \pm 2.9$ h ($p = 0.93$ et 0.65 respectivement). Les nanoparticules de platine ont quant à elles eu un effet légèrement plus important sur la prolifération des cellules F98 : $\tau_{PtNPs, pep.1} = 19.0 \pm 0.3$ h et $\tau_{PtNPs, pep.3} = 22.6 \pm 1.1$ h. Cet effet ne présente pas de différence significative par rapport aux cellules contrôles ($p = 0.49$ et 0.10 respectivement), mais pourrait être corrélé à la faible diminution de la survie des cellules observée plus haut pour ces nanoparticules (cf. Fig. 7.7). Encore une fois, la répétition des expériences un plus grand nombre de fois aurait pu permettre de préciser ces résultats, mais la quantité de NPs disponible était trop faible pour le faire.

7.2.4 Internalisation des Au/Pt NPs par les cellules F98

Les NPs d'or et de platine n'étant pas fonctionnalisées par une molécule fluorescente, l'imagerie des NPs internalisées n'a pas pu être réalisée par une technique de microscopie classique. La microscopie par rayonnement synchrotron a l'avantage d'être une méthode quantitative permettant d'imager des objets nanométriques à des concentrations très faibles. Nous avons utilisé cette méthode pour imager les NPs d'or et de platine internalisées par les cellules F98. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Sylvain Bohic (INSERM U836, ESRF - ID22). Les cellules F98 exposées pendant 24h aux différentes NPs ont été fixées chimiquement ou par cryofixation après incubation, selon les protocoles décrits au paragraphe 6.4.2.3 (p. 97). Elles ont ensuite été scannées en microscopie X afin de cartographier les NPs d'or ou de platine grâce à la détection du rayonnement de fluorescence caractéristique de chaque élément (9.7 et 9.4 keV pour les transitions $M \rightarrow L$ de l'or et du platine respectivement). Les cellules ont été repérées dans les images par l'émission caractéristique du zinc (8.6 keV), abondant dans la matière biologique (cet élément apparaît en rouge dans les images). Les zones les plus intenses dans les images correspondent aux régions les plus épaisses et les plus riches en zinc, *i.e* le noyau. Les images 7.10 et 7.11 présentent les résultats pour chaque type de NPs et pour les deux protocoles de fixation considérés : fixation chimique et cryofixation respectivement.

La méthode de fixation modifie la forme des cellules. Les cellules fixées chimiquement sont étalées sur leur support. Le cytoplasme est large mais un endommagement des membranes n'est pas exclu. Le protocole de cryofixation est plus complexe car sa réussite dépend très sensiblement de la température du bain d'isopentane et de l'air au moment de la fixation, mais il préserve normalement davantage les structures cellulaires. Les cellules cryofixées ont un aspect plus arrondi que les cellules fixées chimiquement.

Les images permettent de cartographier la distribution intracellulaire des NPs. Les cellules contrôles ne présentent pas de NPs, indiquant que le bruit de fond est faible par rapport au signal des conditions positives. Par ailleurs, chaque cellule exposée aux NPs et scannée, contient des atomes lourds, que ce soit pour les AuNPs ou les PtNPs, *peptide 1* ou *peptide 3* (seulement une dizaine de cellules ont été scannées par type de NPs car la durée moyenne d'un scan est d'environ 1h30 et le temps de faisceau alloué pour cette expérience était de 4 jours). Cela montre une certaine homogénéité d'internalisation des NPs entre les cellules. Cependant, il est difficile de conclure à une localisation intranucléaire à partir des images 7.10 et 7.11. En effet, les NPs semblent être réparties de manière assez aléatoire dans les cellules et la technique d'imagerie utilisée ici ne permet pas d'identifier précisément les compartiments subcellulaires pour être sûr de leur localisation à cette échelle. Des expériences préliminaires de microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur les mêmes échantillons après cette expérience de microscopie X . Elles ont permis de s'assurer de l'absence d'agrégats massifs de NPs sur les membranes des cellules mais la localisation intranucléaire ne pourra être vérifiée que par microscopie électronique à transmission. Faute de temps et de NPs, cette expérience n'a pour le moment pas pu être réalisée.

L'intensité de fluorescence a été convertie en quantité d'atomes lourds suite à la calibration de la méthode d'imagerie sur des échantillons standards (cf. 6.4.2.3). Le spectre énergétique des rayonnements détectés est tout d'abord extrait sur le volume d'une cellule. La quantité d'atomes

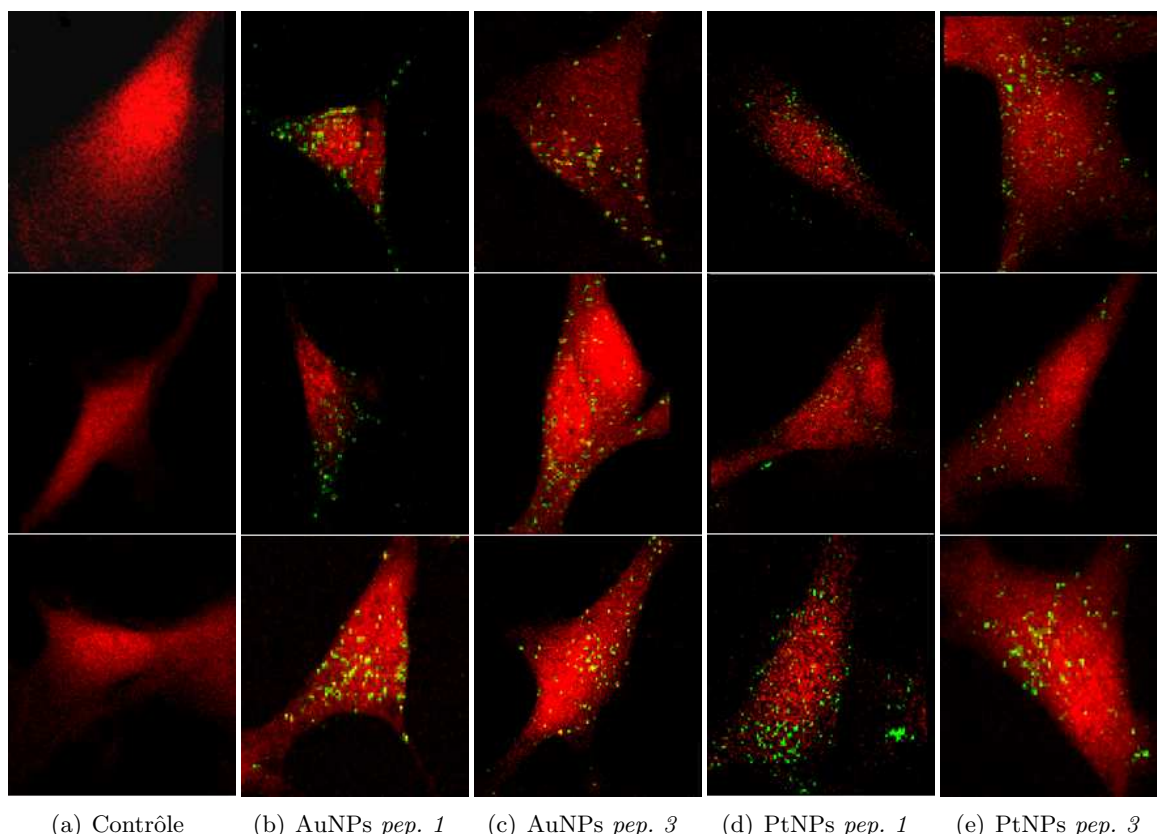


FIGURE 7.10 – **Fixation chimique** : Cellules F98 imagées en microscopie X sur la ligne de lumière ID22 de l'ESRF avec une résolution de 200 nm dans le plan. Trois cellules sont présentées pour chaque condition : (a) cellules contrôles, (b) cellules exposées pendant 24h aux AuNPs *peptide 1*, (c) AuNPs *peptide 3*, (d) PtNPs *peptide 1* et (e) PtNPs *peptide 3*. Les cellules apparaissent en rouge, les NPs en vert.

lourds (Or ou Platine) est ensuite calculée à partir de l'intensité du pic, de la taille de la cellule et de la densité de l'élément. La technique n'est pas confocale dans le sens où le signal correspond à l'intégrale de l'intensité de fluorescence émise sur la totalité de l'épaisseur de l'échantillon. Ce calcul effectué dans chaque cellule scannée, permet d'obtenir une quantité moyenne d'atomes lourds internalisés par cellule. Les tableaux 7.5 et 7.6 regroupent les valeurs moyennes des concentrations internalisées pour les AuNPs et les PtNPs respectivement et ceci, pour chaque protocole de fixation. Les cellules contrôles ont été traitées avec les calibrations propre à l'or et au platine selon le cas.

De manière générale, la cryofixation des cellules conduit à des mesures de concentrations internalisées plus faibles que lorsque les cellules sont fixées chimiquement. Cependant, cette différence n'est significative que pour deux conditions, à savoir, les cellules contrôles analysées à partir du spectre relatif au platine (ce qui n'a pas de sens puisque la concentration mesurée n'est pas réelle mais correspond à un certain bruit de fond), et les cellules exposées aux PtNPs *peptide 1*. Toutes les autres conditions (AuNPs *peptide 1* et *3* et PtNPs *peptide 3*) ne conduisent pas à des différences si-

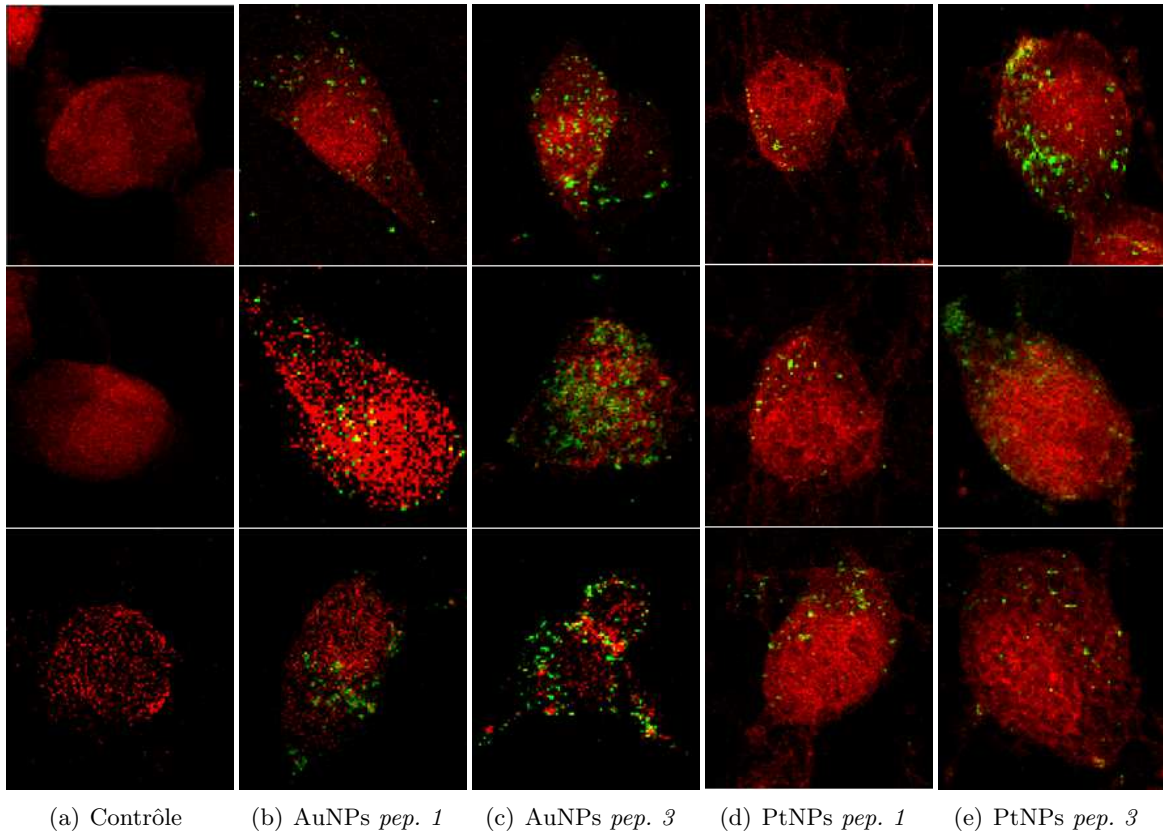


FIGURE 7.11 – **Cryofixation** : Cellules F98 imagées en microscopie X sur la ligne de lumière ID22 de l'ESRF avec une résolution de 200 nm dans le plan. Trois cellules sont présentées pour chaque condition : (a) cellules contrôles, (b) cellules exposées pendant 24h aux AuNPs *peptide 1*, (c) AuNPs *peptide 3*, (d) PtNPs *peptide 1* et (e) PtNPs *peptide 3*. Les cellules apparaissent en rouge, les NPs en vert.

gnificatives. Le faible nombre d'échantillons peut être responsable (au moins en partie) de ces variations, et aujourd'hui, nous n'avons pas d'autres explications précises pour interpréter ce phénomène.

D'autre part, les concentrations d'or internalisées (AuNPs *peptide 1* et *3*) exprimées en pg d'atomes lourds par cellule, sont environ 50 fois plus grandes que celles de platine (PtNPs *peptide 1* et *3*). Si l'on transcrit ces concentrations en nombre de NPs internalisées, on remarque que l'internalisation des AuNPs est toujours plus efficace d'un facteur 5, que celle des PtNPs. En effet, environ 3300 AuNPs seront internalisées en moyenne par les cellules F98, contre seulement 650 PtNPs, après une exposition identique (24h, en présence de $1.6 \cdot 10^{12}\text{ NPs/mL}$ (concentration équivalente à 0.46 et 0.045 mg/mL d'Au et de Pt respectivement (cf. Tab. 7.4)). Le tableau 7.7 regroupe les valeurs précises du nombre de NPs internalisées par cellule pour chaque condition expérimentale. Cette différence entre or et platine ne peut pas être attribuée à la fonctionnalisation des NPs puisque les deux peptides donnent des résultats comparables pour un même élément. La taille des NPs (13 nm et 6 nm pour AuNPs et PtNPs respectivement) est un paramètre qui peut expliquer ce facteur 5.

AuNPs				
Conditions	Fixation	n (Nb cellules scannées)	C (pg Au/cell)	p (Fix. chim / Fix. cryo)
Contrôle	Chimique	6	$4.9.10^{-5} \pm 4.4.10^{-5}$	0.27
	Cryogénie	3	$1.7.10^{-5} \pm 1.5.10^{-5}$	
peptide 1	Chimique	10	0.61 ± 0.59	0.26
	Cryogénie	3	0.20 ± 0.05	
peptide 3	Chimique	8	0.70 ± 0.26	0.19
	Cryogénie	3	0.45 ± 0.28	

TABLE 7.5 – Concentrations moyennes (C) d’or (pg/cell) dans les cellules F98 après 24h d’exposition aux AuNPs fonctionnalisées par le *peptide 1* ou *3*. n indique le nombre de cellules scannées pour la condition. p indique la probabilité que les résultats soient identiques entre les deux protocoles de fixation considérés (Fixation chimique et cryogénique).

PtNPs				
Conditions	Fixation	n (Nb cellules scannées)	C (pg Pt/cell)	p (Fix. chim / Fix. cryo)
Contrôle	Chimique	6	$3.2.10^{-4} \pm 7.6.10^{-5}$	0.02
	Cryogénie	3	$1.3.10^{-4} \pm 1.1.10^{-4}$	
peptide 1	Chimique	8	$8.8.10^{-3} \pm 3.8.10^{-3}$	0.02
	Cryogénie	7	$4.8.10^{-3} \pm 1.8.10^{-3}$	
peptide 3	Chimique	9	$1.49.10^{-2} \pm 8.9.10^{-3}$	0.11
	Cryogénie	8	$9.0.10^{-3} \pm 4.7.10^{-3}$	

TABLE 7.6 – Concentrations moyennes (C) de platine (pg/cell) dans les cellules F98 après 24h d’exposition aux PtNPs fonctionnalisées par le *peptide 1* ou *3*. n indique le nombre de cellules scannées pour la condition. p indique la probabilité que les résultats soient identiques entre les deux protocoles de fixation considérés (Fixation chimique et cryogénique).

Les incertitudes associées aux mesures sont relativement grandes ($0.25 \leq \Delta C/C \leq 0.97$), indiquant que la concentration internalisée peut fortement varier d’une cellule à une autre, pour une même condition. Les ordres de grandeurs restent cependant constants pour chaque élément : 5.10^{-1} et 1.10^{-2} pg/cell pour l’or et le platine respectivement. Enfin, les concentrations moyennes mesurées dans les cellules contrôles donnent une indication sur le bruit de fond. Le problème est négligeable pour l’or où $C_{cont.}/C_{AuNPs} \approx 10^{-4}$. Dans le cas du platine, le bruit de fond est plus important : $C_{cont.}/C_{PtNPs} \approx 0.02$, mais reste insignifiant comparativement aux concentrations mesurées dans les cellules exposées.

Les mêmes mesures de concentrations ont été réalisées par ICP-MS sur les cellules F98 préparées selon le protocole 6.4.1, p. 95. Les faibles quantités de NPs disponibles n’ont pas permis de répéter les mesures un grand nombre de fois et seuls des ordres de grandeurs ont pu être extraits de cette expérience. Encore une fois, les mesures montrent que le choix du *peptide 1* ou *3* ne fait pas de

Conditions	Fixation	C (pg/cell)	C (NPs/cell)
AuNPs <i>peptide 1</i>	Chimique	0.61 ± 0.59	2135 ± 2065
	Cryogénie	0.20 ± 0.05	700 ± 175
AuNPs <i>peptide 3</i>	Chimique	0.70 ± 0.26	2450 ± 910
	Cryogénie	0.45 ± 0.28	1575 ± 980
PtNPs <i>peptide 1</i>	Chimique	$8.8.10^{-3} \pm 3.8.10^{-3}$	316 ± 137
	Cryogénie	$4.8.10^{-3} \pm 1.8.10^{-3}$	173 ± 65
PtNPs <i>peptide 3</i>	Chimique	$1.49.10^{-2} \pm 8.9.10^{-3}$	536 ± 320
	Cryogénie	$9.0.10^{-3} \pm 4.7.10^{-3}$	324 ± 169

TABLE 7.7 – Estimation du nombre de NPs internalisées par cellule à partir de la concentration moyenne internalisée par cellule (C), mesurée par microscopie *X*.

différence en terme d'internalisation des NPs par les cellules. Les NPs d'or ont été trouvées à une concentration intracellulaire de 0.5 pg/cell tandis que celles de platine se trouvaient concentrées à 0.04 pg/cell . Les mesures sont en bon accord avec les résultats de microscopie en fluorescence *X* bien que la concentration de platine mesurée par ICP-MS soit légèrement supérieure à celles mesurées par microscopie.

7.3 Toxicité des nanoparticules *in vivo*

Pour préparer les futurs essais précliniques associant radiothérapie externe et NPs, la toxicité des GdNPs et des AuNPs a été évaluée *in vivo*, sur des rongeurs sains. Les animaux ont reçu une injection des NPs dans l'hémisphère cérébral droit, par la méthode de *Convection Enhanced Delivery* (CED) décrite précédemment et donc le protocole expérimental est donné au paragraphe 6.5, page 99. Les figures 7.12(a) et 7.12(b) représentent les courbes de croissance des animaux après avoir reçu une injection de GdNPs ($5 \mu\text{L}$, 22 mg/mL , $0.5 \mu\text{L/min}$) et de AuNPs ($10 \mu\text{L}$, $1.52 \mu\text{g/mL}$, $0.5 \mu\text{L/min}$) respectivement.

Les animaux ont été suivis pendant trente jours après l'injection. Quelques soient les nanoparticules injectées, ils n'ont présenté aucun trouble du comportement. Leur prise de poids suite à l'injection est similaire à celle d'un animal contrôle, indiquant une bonne tolérance des GdNPs et des AuNPs.

Ces protocoles d'injection seront repris par la suite pour un essai de thérapie pour les AuNPs (cf. paragraphe 10.3.2, p.169) et pour des expériences d'imagerie avec les GdNPs (cf. paragraphe 13.2.2, p.214).

7.4 Conclusion

L'interaction des nanoparticules de gadolinium, d'or et de platine (décrites en introduction de cette partie (p. 83)) avec le modèle cellulaire F98 a été étudiée selon deux axes principaux : La

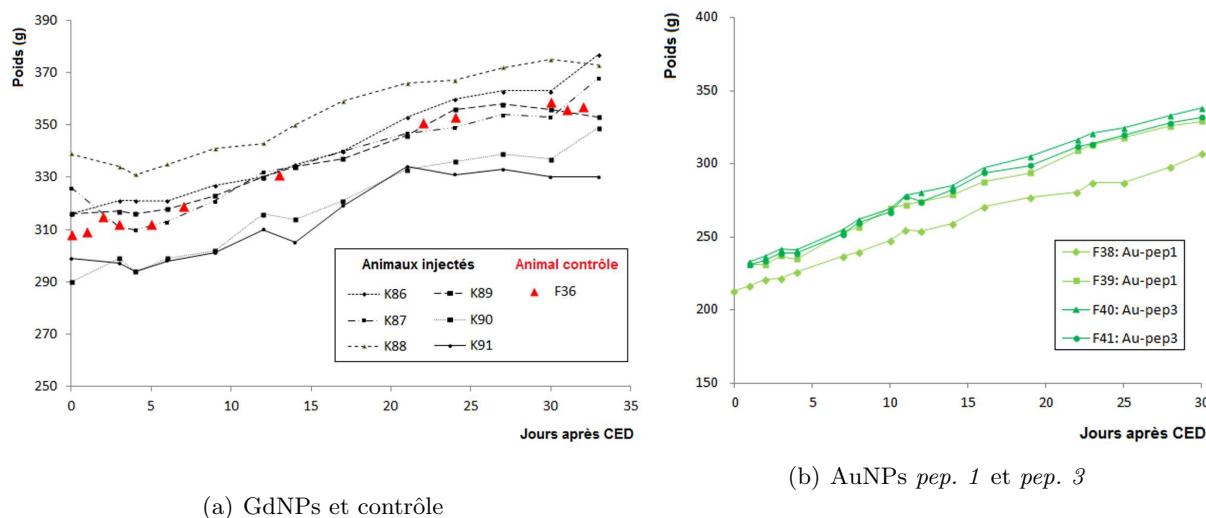


FIGURE 7.12 – Courbes de poids d’animaux sains ayant reçu une injection CED de (a) $5 \mu L$ de GdNPs à 22 mg/mL et (b) $10 \mu L$ d’AuNPs à $1.52 \mu g \text{ Au/mL}$, avec un débit d’injection de $0.5 \mu L/\text{min}$. Les animaux F38 et F39 ont reçu les NPs fonctionnalisées par le *peptide 1*. Les animaux F40 et F41 ont reçu les NPs fonctionnalisées par le *peptide 3*.

cytotoxicité et l’internalisation des NPs. Plusieurs informations importantes ont pu être extraites de ces études.

Dépendance de la toxicité à la concentration des NPs : La toxicité dépend fortement des conditions d’exposition des cellules aux nanoparticules. Les plus grandes quantités de GdNPs disponibles nous ont permis de tester différents protocoles d’incubation faisant varier les concentrations de 0.5 à 2.1 mg Gd/mL et les temps d’incubation de 1 à 24 h . Il est apparu très clairement que la survie des cellules F98 dépend de la combinaison de ces deux paramètres et qu’une trop forte exposition aux NPs diminue significativement la survie cellulaire ($S = 0.23 \pm 0.03$ pour 24 h d’incubation en présence de 2.1 mg Gd/mL contre 0.69 ± 0.16 pour les cellules contrôles - $p = 0.001$). Les quantités disponibles de Au et PtNPs étant plus faibles, nous n’avons pas pu explorer une gamme d’incubations aussi importante. Cependant, nous observons que les AuNPs, qui sont internalisées environ 5 fois plus que les PtNPs (en terme de nombre de NPs par cellule), ont une influence plus importante sur le cycle cellulaire. Là où une exposition de 24 h en présence de $1.6 \cdot 10^{12} \text{ PtNPs/mL}$ (0.045 mg Pt/mL) n’entraîne aucune modification significative de la distribution des cellules dans le cycle ($p > 0.05$ pour chaque condition), la même incubation en présence de AuNPs (0.46 mg Au/mL) modifie cette distribution (cf. 7.2.3, 111). La dépendance de la toxicité des NPs à la dose d’exposition a également été montrée dans plusieurs études, comme par exemple celle de Jena *et al.* qui observent une diminution significative de la viabilité de macrophages exposés à des nanoparticules d’argent (AgNPs, 55 et 278 nm (deux populations mélangées)) pour une concentration d’incubation de 10 ppm ($\approx 1.10^{-2} \text{ mg Ag/mL}$). Une même exposition à $3 \cdot 10^{-3} \text{ mg Ag/mL}$ de AgNPs n’est pas cytotoxique pour les macrophages [Jena 12].

Perturbation du cycle cellulaire : Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à trois

tests différents pour évaluer les effets cytotoxiques des NPs sur les cellules F98 : la mesure de la survie cellulaire par test clonogénique, la mesure de la prolifération cellulaire et la mesure du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Nous l'avons observé avec les GdNPs, une forte exposition aux NPs peut entraîner une diminution de la survie des cellules. Cependant, des concentrations d'incubation plus faibles n'ayant pas d'effet sur la survie, peuvent tout de même induire une perturbation du métabolisme cellulaire. Cette perturbation se traduit dans notre modèle, par une inhibition temporaire de la prolifération cellulaire mesurée avec les GdNPs et une modification du cycle cellulaire qui varie selon le type de NPs :

- **GdNPs** : Pas de modification significative à la fin de l'incubation (5h), hormis un décalage à l'intérieur de la phase S avec une diminution de la proportion des cellules en début de phase et une augmentation en fin de phase. 24h après la fin de l'incubation, on observe une accumulation de $57 \pm 28\%$ des cellules en G2/M ($p = 0.02$) et une diminution de $18 \pm 10\%$ en phase S ($p = 0.05$).
- **AuNPs** : Diminution du nombre de cellules en phases S ($-17.7 \pm 4.5\%$ ($p = 0.02$) et $-17.1 \pm 5.9\%$ ($p = 0.03$) pour les *peptides 1* et *3* respectivement) et G2/M ($-18.1 \pm 5.2\%$ ($p = 0.01$) et $-20.2 \pm 4.8\%$ ($p = 0.01$) pour les *peptides 1* et *3* respectivement) à la fin de l'incubation. Accumulation de $31.4 \pm 10.5\%$ ($p = 0.01$) et de $26.2 \pm 12.1\%$ ($p = 0.03$) des cellules en G2/M 24h après la fin de l'incubation.
- **PtNPs** : Aucune modification significative du cycle cellulaire, quelque soit le peptide (1 ou 3) et quelque soit le temps de fixation.

Les écarts mesurés par rapport aux cellules contrôles doivent être considérés avec prudence du fait du faible nombre de répétitions des expériences. Cependant, les tendances observées indiquent que les NPs d'or et de gadolinium (les plus fortement adsorbées par les cellules F98) induisent un stress des cellules qui se traduit notamment par la perturbation du cycle cellulaire. L'accumulation des cellules en G2/M pourrait indiquer que l'exposition aux NPs entraîne l'apparition de dommages de l'ADN qui empêchent la mitose tant qu'ils ne sont pas réparés. Ce phénomène cytotoxique a déjà été rapporté dans la littérature [Lewi 10] [Aror 12] [Jena 12]. *Lewis et al.* montrent par exemple que des AuNPs vectorisées par un complexe lanthanide ($[Ce]^+$ -AuNPs, 13 nm) augmentent significativement le taux d'histones H2AX phosphorylés chez des fibroblastes humains (4 ± 1 foci/noyau pour les cellules contrôles contre 16 ± 2 chez les cellules exposées) [Lewi 10]. Dans notre étude, nous observons (avec les GdNPs), un effet réversible de l'inhibition de la prolifération cellulaire. Cela semble indiquer que les dommages de l'ADN induits par les NPs peuvent être réparés par les cellules après l'incubation (plusieurs jours) et ne sont donc pas complexes. Cependant, on peut imaginer que si l'on irradie les cellules après une telle incubation, les effets radiotoxiques pourraient être augmentés. Les mécanismes précis de l'induction des dommages à l'ADN par les NPs ne sont pas encore complètement compris et il est difficile de trouver des informations précises à ce sujet. Des expériences complémentaires sur la mesure des dommages de l'ADN permettraient de vérifier cette hypothèse sur notre modèle.

Diversité des mécanismes d'internalisation : Les GdNPs ultra-fines (< 5 nm) sont assez petites pour être internalisées par diffusion passive à travers les membranes cellulaires. Ce résultat est en bon accord avec les observations faites par *Wael Rima* et ses collaborateurs sur les cellules SQ20B exposées à des GdNPs ultra-fines similaires à celles étudiées ici [Rima 13]. Les auteurs montrent qu'environ 5% des GdNPs sont internalisées par voie passive tandis que 95% sont internalisées par voie active (macropinocytose). De la même manière, nous observons par microscopie de fluorescence, que ce mécanisme passif n'est pas dominant. Les expériences ont montré que les GdNPs étaient principalement adsorbées sur les membranes des cellules F98. Cette distribution sub-

cellulaire est peu décrite dans la littérature, qui mentionne plus souvent une internalisation dans le cytoplasme par endocytose. L'étude de *Kong et al.* montre néanmoins une liaison préférentielle de nanoparticules d'or fonctionnalisées par une molécule cysteamine (AET-AuNPs, 10.8 nm), sur les membranes de cellules MCF-7 (cancer du sein). Cette accumulation sur les membranes est attribuée à la charge positive des groupements thiol qui lient les molécules cysteamine aux AuNPs. Cela entraîne une forte interaction électrostatique entre les NPs ainsi chargées et les membranes cellulaires (qui portent une charge négative) [Kong 08]. La spécificité des GdNPs utilisées dans l'étude semble également venir de leur composition chimique. En effet, nous avons répété les dosages ICP-MS et les expériences de microscopie confocale sur un autre lot de synthèse des GdNPs. Ce second lot n'a pas interagi de la même façon avec les cellules F98, montrant deux différences majeures : une internalisation des GdNPs dans le cytoplasme (distribution homogène et pas de formation d'agglomérats sur les membranes. Cf. Fig. 7.13(a)) et des concentrations internalisées plus grandes (plus de 10 pg Gd/cell après 5h d'incubation en présence de 2.1 mg Gd/mL, là où le premier lot ne s'accumulait qu'à une concentration de 0.6 pg Gd/cell (cf. Fig 7.13(b))). La seule différence que nous avons pu mettre en évidence entre les deux lots de GdNPs a été la quantité de FITC : dix fois plus importante sur les GdNPs adsorbées sur les membranes que sur le second lot (selon une estimation faite à partir des mesures de microscopie). Cette différence pourrait expliquer la localisation préférentielle des GdNPs du premier lot sur les membranes, d'autant plus que le changement des propriétés physico-chimiques de molécules liées à du FITC a déjà été rapporté (dans un autre contexte que celui des nanoparticules) [Bing 03] [Rama]. Cependant, cette explication n'est qu'une hypothèse et nécessiterait davantage d'études pour être vérifiée. Les études de radiosensibilisation à venir concerneront les GdNPs décrites dans ce chapitre, c'est à dire celles qui se distribuent de manière préférentielle sur les membranes des cellules.

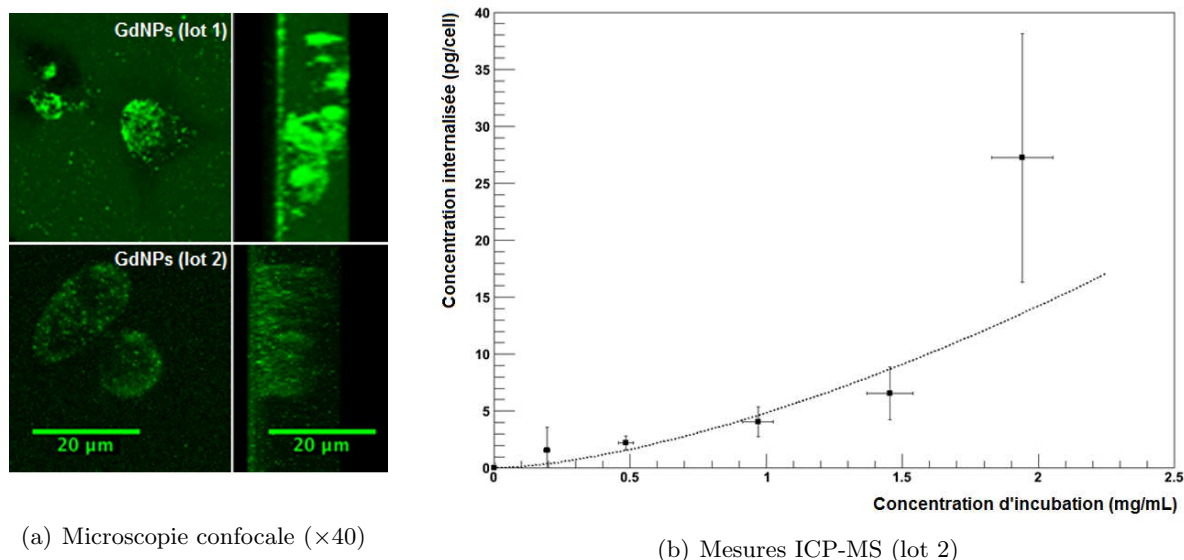


FIGURE 7.13 – (a) Microscopie confocale (vues dans le plan et de profil) des cellules F98 après incubation en présence de GdNPs (2 lots de synthèse différents, le premier lot contient 10 fois plus de FITC que le second). (b) Concentrations de Gd internalisé par les cellules F98 en fonction de la concentration d'incubation (GdNPs issues d'un second lot de synthèse), mesurées par ICP-MS.

Les Au et PtNPs se sont comportées différemment des GdNPs, observant une internalisation plus homogène à l'échelle subcellulaire (cf. Fig 7.10 et 7.11). Les images acquises par micro fluorescence X n'étant pas résolues en z , nous ne pouvons pas conclure sur la localisation intranucléaire des NPs. Des études complémentaires de microscopie électronique à balayage (MEB) sont actuellement en cours afin de vérifier ce paramètre. Un premier balayage rapide a déjà permis de confirmer qu'il n'y avait pas de gros agrégats de NPs sur les membranes cellulaires. Lorsque les cellules ont été fixées chimiquement, on remarque une distribution assez homogène des NPs et notamment au niveau du cytoplasme, dans les zones moins riches en zinc, indiquant l'absence du noyau. Il est difficile de dire si cette localisation est représentative de la réalité ou si le protocole de fixation perméabilise des membranes, laissant ainsi échapper des NPs. Le *peptide 3* semble favoriser l'internalisation des NPs (Au et Pt) par rapport au *peptide 1*. Les incertitudes de mesures sont relativement importantes et ne permettent pas de conclure à des pourcentages d'augmentation précis, mais un facteur 1.5 ou 2 semblerait entrer en jeu entre les deux vecteurs considérés.

Dépendance de l'internalisation à la taille des NPs : Le dernier point mis en évidence ici est la dépendance de l'internalisation des NPs en fonction de leur taille. En effet, la principale différence entre les nanoparticules d'or et de platine réside dans leur taille : 13 et 6 nm respectivement. Ce paramètre semble faire une plus grosse différence en terme d'internalisation que la vectorisation par les *peptides 1* ou *3*, puisqu'à concentration d'incubation identique ($1.6 \cdot 10^{12}$ NPs/mL), les AuNPs se trouvent internalisées de l'ordre de 5 fois plus par les cellules F98 (quelque soit le vecteur) (Cf. Tab. 7.7). Cette dépendance à la taille des nanoparticules a été largement étudiée et rapportée dans la littérature. L'internalisation des NPs dépend à la fois des forces d'adhésion entre la membrane et les nanoparticules, et de la rigidité de la membrane. Leur taille est donc un paramètre important qui peut influencer ce mécanisme. Les modèles convergent pour dire qu'une taille optimale de 20-30 nm de diamètre est nécessaire pour observer une internalisation efficace [Tzli 04] [Gao 05] [Chau 11]. Expérimentalement Chithrani *et al.* ont montré que les AuNPs de 50 nm (parmi une gamme testée allant de 2 à 100 nm) étaient les plus efficacement internalisées par endocytose [Chit 09]. Dans notre cas, nous ne comparons que deux tailles, de 13 et 6 nm. La plus grande internalisation des nanoparticules d'or de 13 nm est cohérente avec l'ensemble des travaux théoriques et expérimentaux publiés sur ce sujet [Chit 09].

Bonne tolérance *in vivo* : Les injections de nanoparticules (gadolinium ou or) par CED dans l'hémisphère droit de rongeurs sains ont été tolérées par 100% des animaux. Aucun trouble du comportement n'a été observé et la prise de poids des animaux est restée comparable à celle d'un animal n'ayant pas reçu d'injection. Ces observations sont très encourageantes pour la perspective de radiosensibilisation tumorale. Dans la suite, ces protocoles d'injection seront repris pour des essais thérapeutiques et des expériences d'imagerie.

Troisième partie

Potentiel des nanoparticules pour la radiosensibilisation tumorale

Chapitre 8

Photoactivation des nanoparticules : simulations aux échelles macroscopique et microscopique.

Sommaire

8.1 Simulations macroscopiques du dépôt de dose	126
8.1.1 Code de simulation MCNPX :	126
8.1.2 Augmentation de dose macroscopique	128
8.1.3 Cas homogène : conséquences à l'échelle de la cellule	128
8.2 Évènements à l'échelle d'une nanoparticule	132
8.2.1 Spectres d'électrons issus d'une nanoparticule	132
8.2.2 Dépendance énergétique du facteur d'augmentation de dose local	136
8.2.3 Prise en compte des NPs : conséquences à l'échelle de la cellule	137
8.3 Objectifs de l'étude	138

Dans la partie précédente, nous avons étudié le comportement de trois différents types de nanoparticules (Gd, Au et Pt) mises au contact de cellules tumorales F98. Il a été montré que la toxicité et l'internalisation des NPs par une même lignée cellulaire dépendaient du type de NPs considéré, de leur taille ainsi que de la concentration, de la température et du temps d'incubation. Ces différents modèles vont maintenant être utilisés en combinaison à une irradiation de photons afin d'étudier leur potentiel radiosensibilisant sur la même lignée cellulaire. Ce travail expérimental a été réalisé en parallèle de la thèse de *Rachel Delorme* qui avait pour objectif principal de modéliser par simulations Monte Carlo, la photoactivation des NPs à l'échelle sub-micrométrique en utilisant les paramètres les plus proches des conditions expérimentales relatives à notre étude.

Cette troisième partie de manuscrit s'organise en trois chapitres. Le premier chapitre introduit les résultats liés aux simulations du facteur d'augmentation de dose engendrée par la présence d'atomes lourds dans un milieu irradié par des photons. Les méthodes expérimentales mises en œuvre pour mesurer l'augmentation de la radiotoxicité observée chez les cellules F98 seront décrites dans un second chapitre. Enfin, l'ensemble des résultats expérimentaux sera présenté dans un dernier chapitre.

Un des objectifs principal de cette thèse a été l'étude expérimentale de l'augmentation de la radiotoxicité induite par les NPs sur les cellules tumorales F98. Dans ce premier chapitre, nous allons présenter les calculs d'augmentation de dose à l'échelle macroscopique qui ont été réalisés dans le cadre de cette thèse. Nous décrirons ensuite les principaux résultats de *Rachel Delorme* qui décrivent les événements physiques ayant lieu autour des NPs irradiées par des photons (à l'échelle sub-micrométrique) et leurs conséquences à l'échelle de la cellule. *Rachel Delorme* (LIST, Laboratoire Modélisation, Simulation et Systèmes, CEA Saclay, France) et moi même, avons réalisé nos thèses en parallèle. Elle avait comme objectif principal de modéliser la photoactivation des NPs (Au et Gd) à l'échelle sub-micrométrique.

Quelque soit l'échelle considérée, les calculs ont été réalisés à partir de simulations Monte Carlo qui gèrent le transport des particules dans la matière. Cette méthode a été développée dans les années 50, avec l'apparition de l'ordinateur. On attribue souvent son invention au mathématicien *Stanislaw Ulam*, alors qu'il réfléchissait aux probabilités de gagner au jeu de cartes connu sous le nom de Solitaire. La méthode consiste à résoudre des problèmes complexes à partir de procédés aléatoires. Elle est utilisée ici pour la génération puis le transport de particules dans la matière où les interactions se produisent selon des probabilités données par les sections efficaces. Selon les processus d'interactions mis en jeu, la particule primaire est absorbée ou diffusée et des particules secondaires peuvent être générées en conséquence. Elles sont suivies à leur tour jusqu'à être totalement absorbées ou sortir du volume d'intérêt. Selon le cas, différents codes de simulations Monte Carlo ont été utilisés. Nous les décrirons aux sections suivantes.

8.1 Simulations macroscopiques du dépôt de dose

8.1.1 Code de simulation MCNPX :

Les calculs de l'augmentation de dose à l'échelle macroscopique (cm^3) ont été réalisés avec le code Monte Carlo MCNPX (Monte Carlo N-Particle eXtended) *v2.7.e*. Ce code a été créé à *Los Alamos National Laboratory* pour le transport des neutrons d'abord, puis des photons et des électrons. Il assure le transport de ces particules sur une gamme étendue d'énergies : de 1 *keV* à 1 *MeV*. Notre équipe est depuis 2004, utilisatrice des versions dites "bêta", ce qui lui permet de disposer des mises à jour. Dans cette étude, nous ne considérons que le transport des photons et des électrons.

Géométrie : La figure 8.1 représente la géométrie d'irradiation considérée dans l'étude. Un cube de 1 *cm* de côté contenant de l'eau ou un mélange d'eau et de gadolinium (homogène) est placé au centre d'une sphère de 10 *cm* de diamètre, remplie d'air. La source est carrée (2 *cm* de côté) est centrée sur le cube. Elle est placée à 5 *cm* de celui-ci et dirigée perpendiculairement à l'une de ses faces. On considèrera entre 10^8 et 10^9 photons incidents pour chaque calcul, de sorte à obtenir une incertitude de calcul inférieure à 5%.

Transport des particules : Le code de simulation MCNPX contient différent modes de transport des particules. Il peut gérer soit les photons {mode p}, soit les électrons {mode e}, soit les deux à la fois {mode p e}. Ce dernier mode a été utilisé pour nos simulations ainsi que le modèle physique détaillé. Ce modèle est plus complet que le modèle physique simple également disponible, car, en plus des interactions photoélectriques, Compton et productions de paires, il modélise les processus

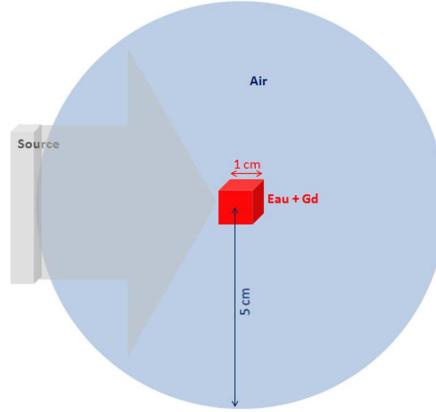


FIGURE 8.1 – Géométrie d’irradiation considérée pour le calcul du facteur d’augmentation de dose en présence de gadolinium avec le code de simulation MCNPX. Un cube de 1 cm de côté, contenant du gadolinium et/ou de l’eau est placé au centre d’une sphère d’air de 10 cm de diamètre.

de diffusion cohérente ainsi que la production de photons de fluorescence et d’électrons Auger. Les photons sont suivis un à un jusqu’à sortir du volume d’intérêt ou être totalement absorbé (énergie de coupure établie à 1 keV). Les électrons, qui, à perte d’énergie égale, subissent un nombre d’interactions beaucoup plus grand que les photons, sont gérés de manière condensée.

Les probabilités utilisées pour définir les processus d’interactions des particules sont issues de bibliothèques de données propres au logiciel MCNPX (MCPLIB04 pour les photons et EL04 pour les électrons), mais qui sont construites à partir des sections efficaces d’interaction des photons (XCOM) et des valeurs de pouvoir d’arrêt des électrons (ESTAR), accessibles librement sur le site internet du NIST (*National Institute of Standards and Technology*).

Les tally, compteurs de particules : Des ”compteurs de particules” sont disponibles dans MCNPX et peuvent être placés dans des zones définies par l’utilisateur (dans le cube central de la géométrie 8.1, dans notre cas). Trois compteurs particuliers permettent d’estimer une dose : le tally dénommé *F4 (MeV/cm^2) donne accès à la valeur du Kerma. Le tally F6, à celle de l’énergie déposée en moyenne dans un volume (MeV/g) et le tally *F8, à celle de l’énergie impartie (MeV). Nous considérons dans nos simulations le tally F6, qui permet un calcul plus rapide de la dose déposée dans un volume d’intérêt que le tally *F8, avec une précision suffisante dans le cas de notre géométrie macroscopique.

$$F6 = E \cdot \frac{Poids \cdot Trace}{Volume} \cdot \frac{\rho_a}{\rho} H(E) \quad (8.1)$$

Poids, indique le poids attribué à la particule. Dans notre cas, il vaut 1, de manière à considérer une importance équivalente pour chaque particule. *Trace* indique la longueur du parcours des particules dans le *Volume* d’intérêt. ρ_a est la densité atomique ($atomes/cm^3$), ρ est la masse volume (g/cm^3) et $H(E) = \sigma_T(E)H_{moy}(E)$, avec :

$$H_{moy}(E) = \sum_{i=1}^3 p_i(E)(E - \bar{E}_{out}) \quad (8.2)$$

Dans cette expression, σ_T désigne la section efficace totale d’interaction, p_i , la probabilité de l’évènement i ($i = 1$, diffusion incohérente, $i = 2$, production de paires, $i = 3$, effet photoélectrique), E , l’énergie incidente de la particule et \bar{E}_{out} , est l’énergie sortante moyenne. Les photons et électrons

créés ou diffusés avec une énergie inférieure à 1 *keV* sont ajoutés au dépôt d'énergie.

Facteur d'augmentation de dose (DEF) : L'augmentation de dose dans un cube contenant du gadolinium à différentes concentrations a été évaluée par rapport à la dose déposée dans un cube ne contenant que de l'eau. Le facteur d'augmentation de dose (DEF, pour *Dose Enhancement Factor*) a été calculé comme le rapport des estimateurs *F6* relatifs aux conditions avec et sans gadolinium.

$$DEF = \frac{F6_{[Gd]>0}}{F6_{[Gd]=0}} \quad (8.3)$$

8.1.2 Augmentation de dose macroscopique

Le DEF a été évalué en fonction de l'énergie des photons incidents, entre 10 *keV* et 1.25 *MeV* et en fonction de la concentration en gadolinium dans le milieu (1-50 *mg/mL*) (cf. Fig. 8.2(a) et 8.2(b)).

Le DEF présente une dépendance énergétique importante (cf. Fig. 8.2(a)). Il est supérieur à 1 dans le domaine du *keV*, indiquant un effet positif de la présence du gadolinium au moment de l'irradiation. A l'inverse, il tend vers 1 pour une irradiation à 1.25 *MeV*, illustrant le fait que pour cette énergie, les sections efficaces d'interaction des photons sont très peu différentes dans l'eau et dans le gadolinium. Le K-edge du gadolinium (50.25 *keV*) est repéré par une augmentation brutale du DEF, dont l'amplitude est d'autant plus grande que la concentration en gadolinium est importante. Le maximum d'augmentation de dose se trouve à l'énergie pour laquelle la différence d'absorption des rayons *X* est maximale entre l'eau et le gadolinium. Il s'agit ici de 60 *keV*. L'amplitude du DEF dépend largement de la concentration de gadolinium présente dans le milieu irradié et augmente par exemple jusqu'à 2.54 ± 0.04 pour une irradiation de 10 *mg Gd/mL* à 60 *keV*. On observe une relation linéaire entre ces deux quantités entre 0 et 10 *mg Gd/mL* pour une irradiation à 51.0 *keV* et jusqu'à 20 *mg/mL* à 49.5 *keV* (cf. Fig. 8.2(b)).

Ces calculs illustrent parfaitement l'augmentation de dose moyennée sur un volume important, pour une concentration d'atomes lourds donnée. Il est tout à fait représentatif de l'augmentation de dose observée dans le cas d'un mélange d'eau et d'agent de contraste (mélange homogène de composés moléculaires), mais ne représente pas la totalité des phénomènes impliqués dans le cas d'un assemblage des atomes lourds sous forme de NPs. Les sections qui suivent présentent les principaux résultats de *Rachel Delorme*, décrivant les conséquences de cette distribution homogène à l'échelle cellulaire d'abord, puis les phénomènes à l'échelle d'une NP ensuite.

8.1.3 Cas homogène : conséquences à l'échelle de la cellule

Le code de simulation Monte Carlo PENELOPE (Penetration and ENergy LOss of Positrons and Electrons) a été utilisé pour cette étude. De la même manière que MCNPX, PENELOPE permet de simuler le transport des électrons et des photons dans la matière, mais il est mieux adapté aux conditions de la physique médicale (basses énergies et suivi des particules secondaires jusqu'à des énergies inférieures au *keV*). Les géométries d'irradiation sont présentées pour chaque cas, et les paramètres de simulations pourront être trouvés dans le manuscrit de thèse de *R. Delorme* [Delo 13].

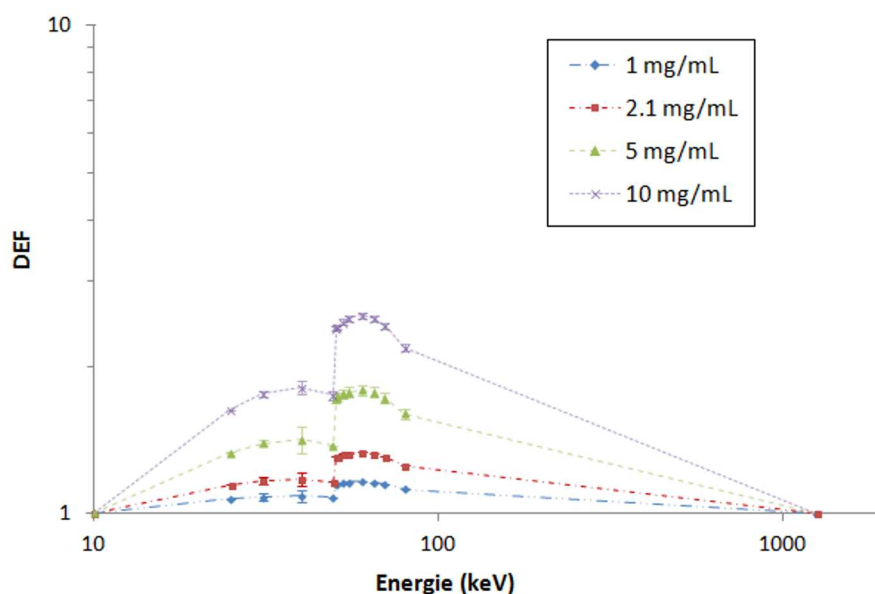
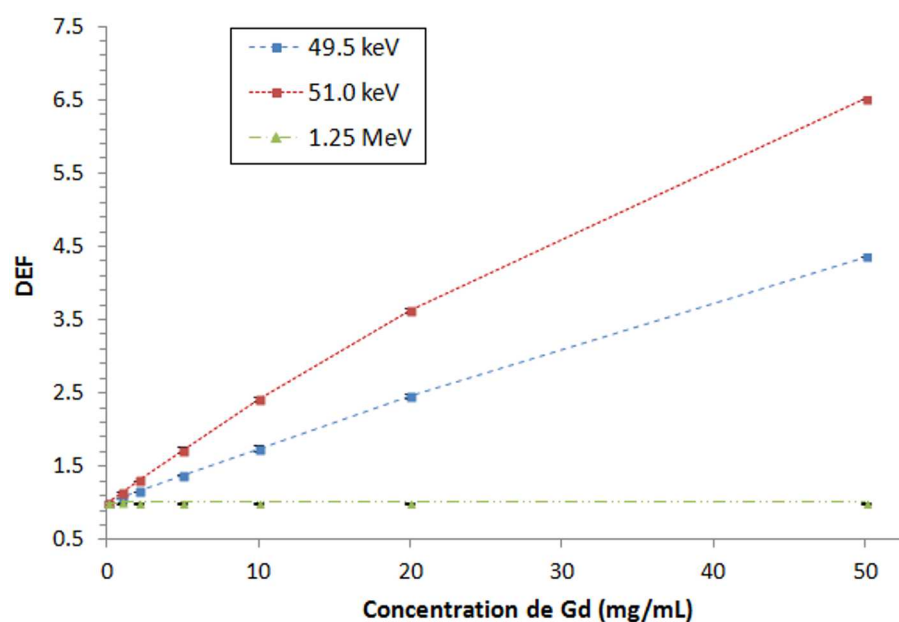

(a) DEF macroscopique *versus* énergie des photons

(b) DEF macroscopique *versus* concentration de Gd

FIGURE 8.2 – (a) DEF macroscopique calculé, en fonction de l'énergie des photons incidents, par simulations Monte Carlo dans un cube d'eau de 1 cm^3 contenant différentes concentrations de gadolinium : 1, 2.1, 5 et 10 mg/mL . (b) Relation entre le DEF macroscopique et la concentration de gadolinium dans le milieu irradié, pour trois énergies incidentes : 49.5, 51.0 keV et 1.25 MeV.

Une géométrie "unicellulaire" a été considérée afin de simuler le facteur d'augmentation de dose dans trois différentes régions de la cellule : son noyau, son cytoplasme et sa membrane. La géométrie de la cellule telle qu'elle a été considérée dans l'étude est représentée sur la figure 8.3. La cellule

de $10\ \mu\text{m}$ de diamètre est sphérique. Elle possède un noyau centré de $4\ \mu\text{m}$ de diamètre et une membrane d'épaisseur égale à $7.5\ \text{nm}$. La cellule est placée au centre d'un cube rempli d'eau (ou d'un mélange homogène d'eau et de Gd selon la condition) de $15\ \mu\text{m}$ de côté et la source de photons carrée ($15\ \mu\text{m}$ de côté) est placée sur l'une des faces du cube. Ce petit volume autour de la cellule a été choisi afin de limiter les volumes à modéliser et gagner en temps de calcul.

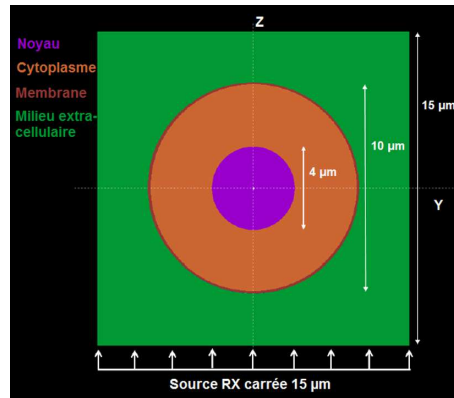


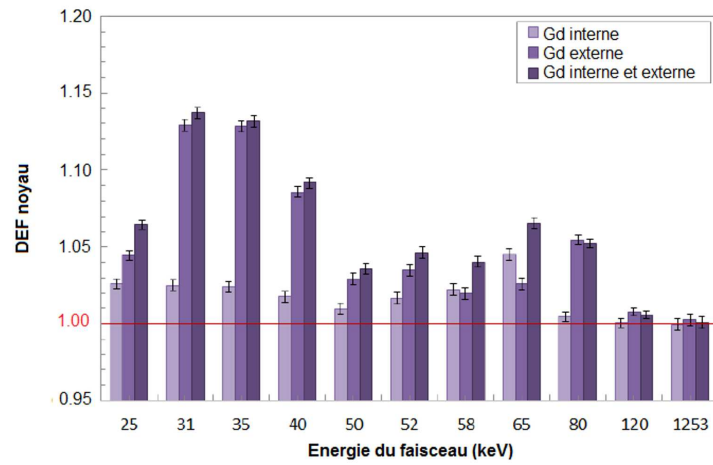
FIGURE 8.3 – Géométrie utilisée pour les simulations du DEF au noyau, au cytoplasme et à la membrane d'une cellule. La cellule est sphérique ($10\ \mu\text{m}$ de diamètre). Elle possède un noyau centré de $4\ \mu\text{m}$ de diamètre et une membrane d'épaisseur égale à $7.5\ \text{nm}$. La cellule est placée au centre d'un cube d'eau de $15\ \mu\text{m}$ de côté et la source de photons de section carrée ($15\ \mu\text{m}$ de côté) est placée sur l'une des faces du cube [Delo 13].

Trois distributions de gadolinium ont été modélisées :

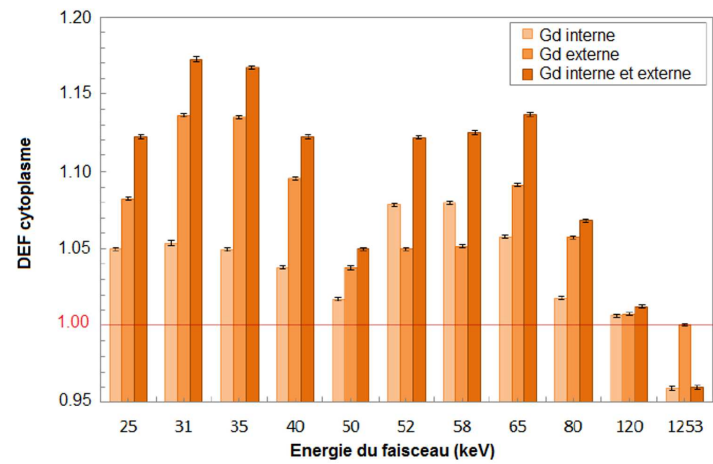
- Les NPs sont *internalisées* dans le cytoplasme des cellules. Dans ce cas, le cytoplasme (orange sur la figure 8.3) est rempli d'un mélange homogène d'eau et de gadolinium ($0.6\ \text{mg/mL}$).
- Les NPs sont *externes* aux cellules. Dans ce cas, le milieu extracellulaire (vert sur la figure 8.3) est rempli d'un mélange homogène d'eau et de gadolinium ($1.8\ \text{mg/mL}$).
- Les NPs sont *externes et internalisées*. Dans ce cas, les deux distributions précédentes sont additionnées.

Les valeurs des concentrations ont été choisies en fonction des dosages ICP-MS qui ont été présentés dans la partie expérimentale précédente (cf. paragraphe 7.1.4, p. 105).

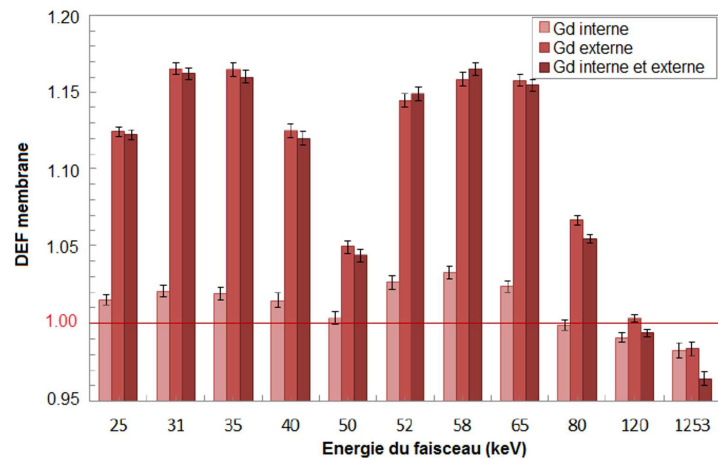
Les facteurs d'augmentation de dose au noyau, au cytoplasme et à la membrane sont présentés sur les figures 8.4(a), 8.4(b) et 8.4(c) respectivement, en fonction de l'énergie des photons incidents et pour les trois distributions de gadolinium décrites ci-dessus.



(a) DEF au noyau



(b) DEF au cytoplasme



(c) DEF à la membrane

FIGURE 8.4 – DEF calculés dans (a) le noyau, (b) le cytoplasme et (c) la membrane d'une cellule irradiée en présence de gadolinium *internalisé*, *externe* ou *internalisé + externe* à différentes énergies de photons incidents. Le gadolinium est ajouté comme un mélange homogène dans l'eau [Delo 13].

De manière générale, nous observons des DEFs petits (toujours < 1.2) et ce, en raison des faibles concentrations de gadolinium considérées (0.6 mg/mL dans le cytoplasme et 1.8 mg/mL dans le milieu extracellulaire). Les DEFs au noyau et à la membrane générés par le gadolinium internalisé sont très faibles (< 1.05). Cela s'explique par le petit nombre d'électrons produits avec une énergie adéquate pour atteindre ces régions. Le DEF au cytoplasme est légèrement plus grand car il tient compte des électrons de très basse énergie, qui déposent leur énergie localement et comptent pour la dose.

Lorsque le gadolinium est ajouté dans le milieu extracellulaire, le DEF augmente jusqu'à 1.15 environ. La plus forte concentration de Gd (1.8 mg/mL dans le milieu extracellulaire) explique cette augmentation. Il est intéressant de noter l'asymétrie observée pour le DEF au noyau (cf. Fig. 8.4(a)). L'augmentation de dose est en effet plus importante à basse énergie (30-40 keV) qu'au dessus du K-edge du gadolinium. Le plus grand nombre d'interactions photoélectriques en couche L à ces basses énergies produisent des photo-électrons assez énergétiques ($> 30 \text{ keV}$), capables de déposer leur énergie jusqu'au noyau. Au dessus du K-edge du gadolinium, les interactions en couche K deviennent majoritaires et génèrent des photo-électrons d'énergie plus faible qui contribuent moins à la dose au noyau. Les DEF calculés au cytoplasme et à la membrane ne présentent pas cette asymétrie. Ces régions étant plus proches du milieu extracellulaire, le dépôt de dose y est moins dépendant de l'énergie des électrons secondaires. Par ailleurs, on remarquera qu'à 1.25 MeV , l'augmentation de dose est nulle quelque soit la distribution de gadolinium et le volume considérés.

Ces petites valeurs de DEF ne semblent pas pouvoir expliquer les nombreux résultats expérimentaux qui ont montrés un fort pouvoir radiosensibilisant des NPs en combinaison à une irradiation de photons à la fois *in vitro* et *in vivo*, que nous avons en partie décrits au chapitre 4, p. 61 [Jain 10], [Butt 12], [Hain 04], [Hain 12]. Nous verrons également par la suite que ces simulations n'expliquent pas entièrement la survie des cellules F98 mesurée expérimentalement après une irradiation de photons en présence de GdNPs *externes* ou *adsorbées* sur les membranes (cf. chapitre 10, p. 153). L'hétérogénéité de dose à l'échelle nanométrique semble devoir être prise en compte dans les modèles pour mieux expliquer la réponse à l'échelle de la cellule. D'autre part, il faut garder en mémoire que la modélisation des interactions physiques seules, ne permet pas de rendre compte de la complexité de l'ensemble des phénomènes produits, en particulier des phénomènes biologiques qui ne sont pas pris en compte dans ces simulations.

8.2 Évènements à l'échelle d'une nanoparticule

8.2.1 Spectres d'électrons issus d'une nanoparticule

Rachel Delorme s'est intéressée aux particules secondaires émises par les nanoparticules de gadolinium et d'or irradiées par des faisceaux de photons. Cette étude très locale autour des NPs (dans une sphère de 500 nm de rayon) permet de comprendre l'influence de la présence de tels nano-objets dans un faisceau de photons en terme de production d'électrons, mais également en terme d'augmentation de dose. Le code de simulation PENELOPE a été utilisé pour cette étude. La figure 8.5 illustre la géométrie considérée pour l'étude. Une NP sphérique de 100 nm de diamètre a été placée au centre d'une sphère d'eau de 500 nm de rayon. La source de photons, circulaire (100 nm de diamètre), est située juste en dessous de la NP. Plusieurs grandeurs sont mesurées : la dose moyenne dans la sphère d'eau de 500 nm et une grille de dose sur tout le volume. La grille est

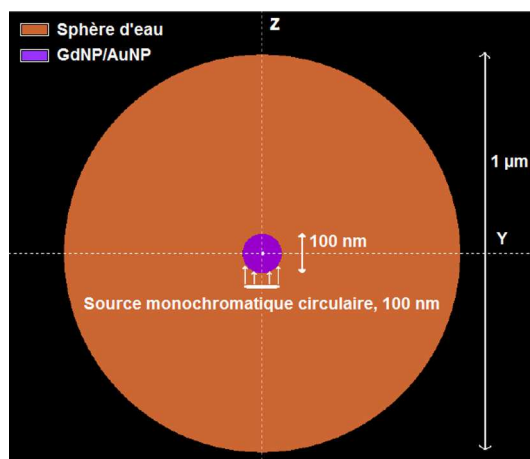


FIGURE 8.5 – Représentation dans le plan YZ de la géométrie d'une nanoparticule, utilisée pour obtenir les spectres d'électrons secondaires émis à la sortie de celle-ci lorsqu'elle est irradiée [Delo 13].

calculée sur un cube d'un micromètre de côté avec une taille de voxel de 10 nm.

Le spectre d'électrons secondaires produits à la sortie d'une NP d'or est présenté par la figure 8.6(a) et comparé au spectre d'électrons produits dans un même volume rempli d'eau. Le spectre d'électrons secondaires générés par une NP de gadolinium est représenté sur la figure 8.6(b). Dans cette deuxième étude, différents rayons de NPs ont été considérés. Les électrons ont été suivis jusqu'à une énergie de 1 keV pour ces simulations.

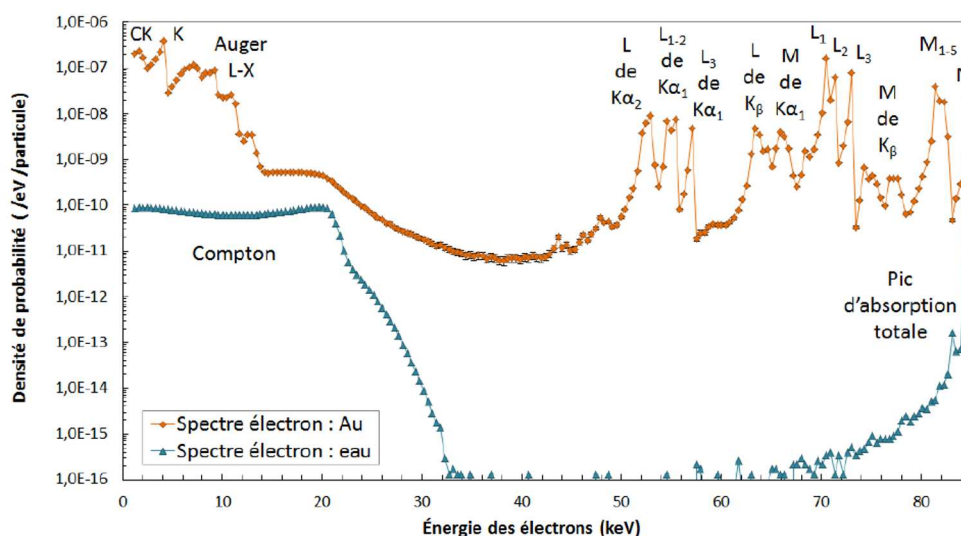
La figure 8.6(a) permet de mettre en évidence la forte augmentation de la production des électrons secondaires à la sortie de la nanoparticule par rapport à une irradiation dans l'eau. La différence peut aller d'un facteur 10 à un facteur 10^9 selon l'énergie des électrons et montre clairement que la présence d'une telle nanoparticule dans le milieu irradié peut conduire à une hétérogénéité de dose localement très importante.

Pour cette énergie de photons incidents (85 keV, au dessus du K-edge de l'or qui se situe à 80.7 keV) deux principaux types d'électrons de très basse énergie (≤ 15 keV) sont produits en grand nombre :

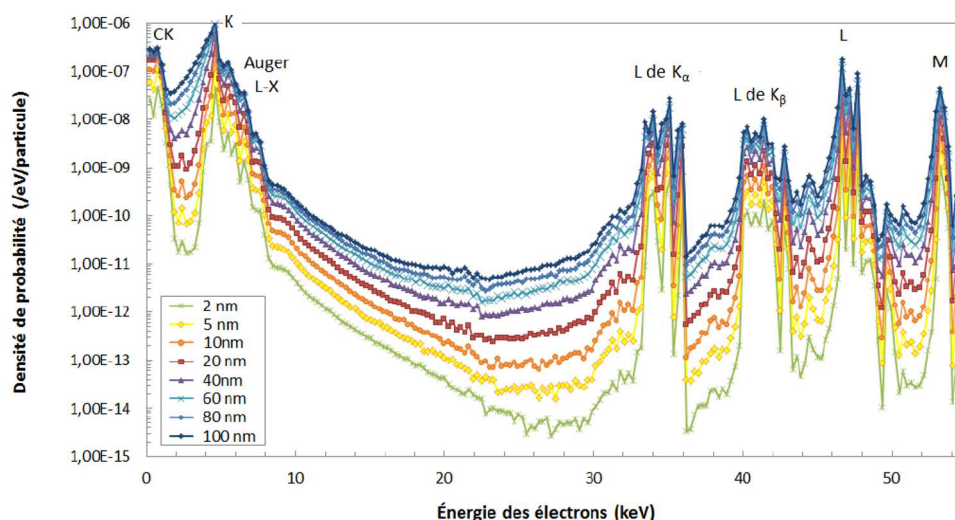
- Les photo-électrons issus des interactions photo-électriques en couche K des atomes d'or. Leur énergie est ici environ égale à 4 keV (elle augmente bien entendu avec l'énergie des photons incidents).
- Les électrons Auger, issus du réarrangement du cortège électronique après une ionisation en couche électronique profonde.

Ces électrons de basse énergie ont un parcours très faible dans l'eau, de l'ordre de 1 μm [Nikj 10] et une probabilité importante d'être absorbés par la NP elle-même (d'autant plus que son diamètre est grand) [Leun 11] [Lech 11]. Ces électrons de basse énergie n'auront de conséquences biologiques que s'ils sont générés à proximité direct des cibles biologiques critiques (ADN, membrane, etc). Cela nécessite une distribution intracellulaire précise des NPs.

Des photo-électrons de plus grande énergie (> 30 keV) issus des interactions photo-électriques sur les couches L et M principalement, dont le parcours moyen dans l'eau est supérieur à 10 μm (diamètre typique d'une cellule), sont également produits en grand nombre à la sortie de la NP.



(a) Irradiation d'une AuNPs (100 nm) par un faisceau de photons de 85 keV



(b) Irradiation d'une GdNPs par un faisceau de photons de 55 keV

FIGURE 8.6 – (a) Spectres d'électrons secondaires générés autour d'une nanoparticule de 100 nm de diamètre composée d'or (rouge) ou remplie d'eau (bleu) et irradiées par un faisceau de photons monochromatique de 85 keV. (b) Spectres d'électrons secondaires générés autour d'une nanoparticule de gadolinium et irradiées par un faisceau de photons monochromatiques de 55 keV. La dépendance au rayon de la nanoparticule a été étudiée entre 2 et 100 nm [Delo 13].

Leur taux de production est certes environ 10 à 100 fois plus faible que celui des photo-électrons générés en couche K, mais leur parcours plus grand peut s'avérer intéressant pour augmenter la radiotoxicité si les NPs ne sont pas internalisées dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules.

Une NP de gadolinium irradiée de la même façon par un faisceau de photons de 55 keV (au dessus du K-edge du gadolinium qui se situe à 50.25 keV), conduit à un spectre d'électrons se-

condaires semblable, bien que les raies caractéristiques d'émission soient décalées en énergie. La figure 8.6(b) illustre la relation entre le taux d'électrons secondaires générés et la taille de la NP. Ce taux est globalement plus faible pour les petites NPs et ce, à cause de la quantité d'atomes lourds plus faible. Cependant, le phénomène de réabsorption de l'énergie y est proportionnellement moins important comme le montre le calcul du facteur d'augmentation de dose (DEF) dans la géométrie définie sur la figure 8.3 (cf. Fig. 8.7). Le DEF local autour de la NP, calculé comme le rapport des doses déposées dans la sphère contenant le NP ou remplie d'eau, est plus important pour les NPs de petite taille ($< 10 \mu m$) que pour celles de plus grand diamètre.

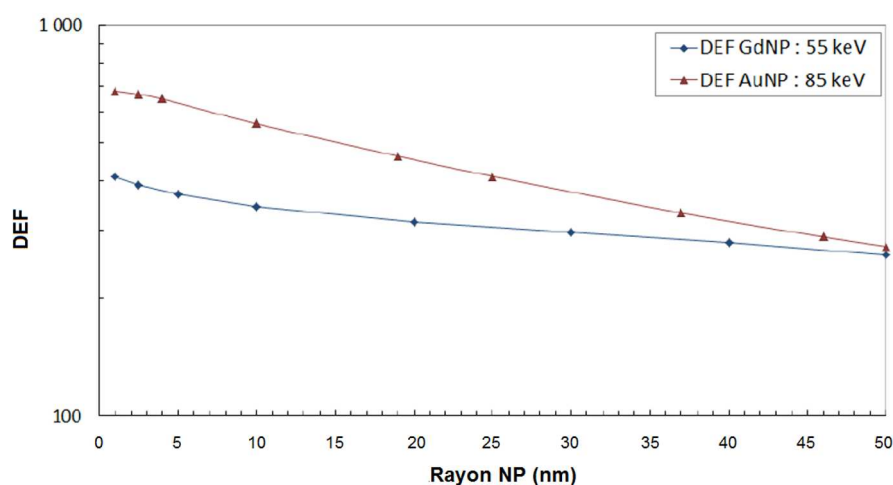


FIGURE 8.7 – DEF calculé dans une sphère de 500 nm de rayon remplie d'eau et contenant une NP d'or ou de gadolinium de rayon variable en son centre. Les éléments (or ou gadolinium) sont irradiés par un faisceau de photons monochromatique d'énergie supérieure au K-edge : 85 et 55 keV pour l'or et le gadolinium respectivement [Delo 13].

Bien que les études présentées ici considèrent un rayonnement monochromatique (générant des spectres électroniques bien définis), ces observations rejoignent les conclusions apportées par *Lechtman et al.* qui considèrent la photoactivation de NPs par des rayonnements de photons polychromatiques. Les auteurs suggèrent deux options différentes afin d'augmenter l'efficacité biologique à l'échelle de la cellule [Lech 11] :

- Utiliser un rayonnement dont l'énergie est optimisée pour favoriser la production d'électrons Auger de basse énergie ($< 10 \text{ keV}$), en combinaison à de petites NPs localisées à moins de $2 \mu m$ du noyau. Ces électrons ont un haut TEL et une efficacité biologique importante.
- Utiliser un rayonnement d'énergie plus importante pour favoriser la production de photo-électrons dont le parcours moyen est plus grand (de l'ordre de $10 \mu m$) mais pouvant avoir une efficacité biologique même s'ils sont générés en dehors des cellules ou à distance des noyaux. La taille des NPs est dans ce cas moins importante puisque les seuls électrons efficaces sont ceux de plus grande énergie, dont la probabilité d'être absorbés par les NPs est faible.

Enfin, *Rachel Delorme* précise dans son travail de thèse, le caractère isotrope de l'émission

des particules secondaires autour d'une nanoparticule, les nano-objets agissant comme sources secondaires de rayonnements électroniques dans toutes les directions de l'espace [Delo 13].

8.2.2 Dépendance énergétique du facteur d'augmentation de dose local

La dépendance du DEF local (calculé dans une sphère de 500 nm de rayon remplie d'eau et contenant une NP d'or ou de gadolinium de 100 nm de diamètre en son centre) a également été étudiée. Les résultats sont présentés par la figure 8.8.

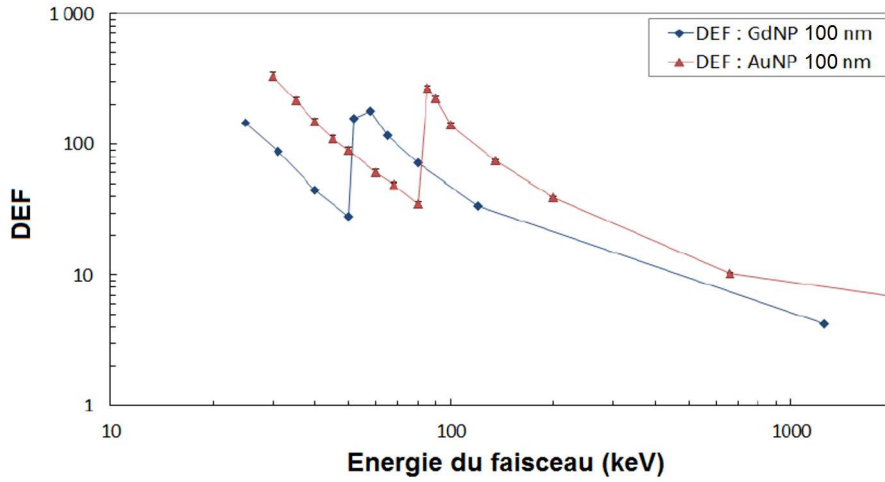


FIGURE 8.8 – DEF calculé dans une sphère de 500 nm de rayon remplie d'eau et contenant une NP d'or ou de gadolinium de 100 nm de diamètre en son centre. L'énergie des photons incidents varie entre 25 et 1200 keV [Delo 13].

Le DEF local ainsi calculé atteint des valeurs très grandes, jusqu'à 400 pour l'or. L'or conduit globalement à une augmentation de dose plus grande que le gadolinium du fait de son numéro atomique plus important ($Z_{Au} = 79$ et $Z_{Gd} = 64$). L'augmentation de dose est maximale dans la gamme du keV et diminue fortement ensuite jusqu'à être inférieure à 10 à haute énergie (1 MeV). La présence du K-edge est marquée par une brutale augmentation du DEF à 50.25 et 80.7 keV pour le gadolinium et l'or respectivement. La dépendance énergétique observée ici est en accord avec l'ensemble des données de la littérature sur ce sujet [Leum 11] [McMa 11], [Lech 11]. L'effet est largement préférentiel à basse énergie (keV) où les sections efficaces d'interactions des photons avec les atomes lourds sont plus grandes qu'avec les atomes légers et cette dépendance énergétique représente la signature de la photoactivation des atomes lourds. Cependant, nous observons ici que contrairement au DEF considéré dans un volume macroscopique (cm^3) (cf. Fig. 8.2, p. 129), le DEF local calculé à 1.25 MeV n'est pas égal à 1, mais vaut entre 4 et 7 pour le gadolinium et l'or respectivement. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène : le réarrangement du cortège électronique d'un atome de gadolinium ionisé est plus complexe que celui d'un atome d'hydrogène ou d'oxygène composant l'eau. Les électrons de très basse énergie mis en mouvement à ce moment là peuvent être responsables de cette petite augmentation de dose locale. Par ailleurs, il n'est pas exclu que pour une telle taille de NPs, les électrons secondaires issus des

interactions photons/matière interagissent à leur tour avec la nanoparticule de sorte à générer de nouveaux électrons responsables du DEF supérieur à 1 dans cette gamme d'énergies. Cette seconde option est cependant à relativiser par le fait que le taux d'électrons produits à haute énergie était 10^5 fois plus faible qu'à 25 keV par exemple [Delo 13].

8.2.3 Prise en compte des NPs : conséquences à l'échelle de la cellule

Le code de simulation Geant4¹ a initialement été développé pour les hautes énergies spécifiques de la physique des particules, mais il s'oriente maintenant vers les applications médicales avec le développement de Geant4-DNA par exemple. Ce code de simulation a été utilisé pour le calcul des DEFs, au noyau, à la membrane et au cytoplasme d'une cellule, en considérant la forme "nanoparticule" des éléments lourds. Cette contrainte nécessite en effet la gestion de nombreux volumes (de l'ordre du million à l'échelle d'une cellule) qui sont plus facilement gérés avec Geant4 qu'avec PENELOPE. Encore une fois, les géométries des simulations seront décrites en mêmes temps que les résultats de l'étude. Les paramètres de simulation peuvent quant à eux être trouvés dans le manuscrit de thèse de Rachel Delorme [Delo 13].

Comme précédemment, différentes distributions de gadolinium ont été considérées. La figure 8.9 les illustre : (a) le Gd est distribué de manière homogène dans le cytoplasme, (b) le Gd est distribué sous forme de vésicules (six sphères de 340 nm de diamètre dans le cytoplasme), (c) le Gd est distribué sous forme de 237 NPs de 100 nm de diamètre distribuées aléatoirement dans le cytoplasme ou, (d) distribuées sur une fine couche autour de la cellule. La quantité (en masse) de gadolinium est constante pour chaque cas et vaut environ 1 pg. La source de photons carrée (15 μm) est positionnée de la même manière que précédemment, sur l'une des faces du cube dans lequel est immergée la cellule.

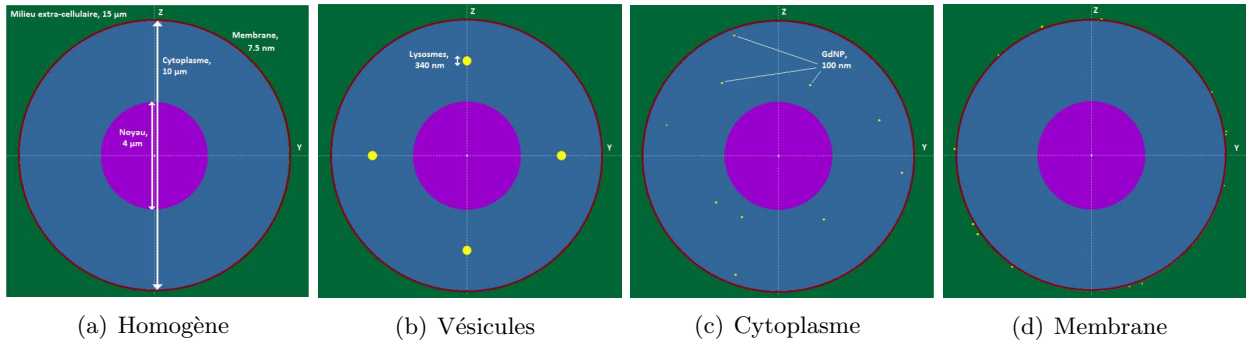


FIGURE 8.9 – Géométries considérées pour l'étude de la réponse cellulaire en présence de NPs distribuées (a) de manière homogène dans le cytoplasme, (b) dans six lysosomes (sphères jaunes de 340 nm de diamètre remplies de Gd), (c) dans 237 GdNPs de 100 nm chacune réparties aléatoirement dans le cytoplasme et (d) dans 237 GdNPs de 100 nm chacune réparties en une fine couche autour de la membrane [Delo 13]. La quantité (en masse) de gadolinium est constante pour chaque cas de figure et vaut environ 1 pg.

Les facteurs d'augmentation de dose calculés au noyau, dans le cytoplasme et à la membrane

1. <http://geant4.cern.ch/>.

sont présentés sur les figures 8.10(a), 8.10(b) et 8.10(c) respectivement en fonction de l'énergie des photons incidents et des différentes distributions de GdNPs.

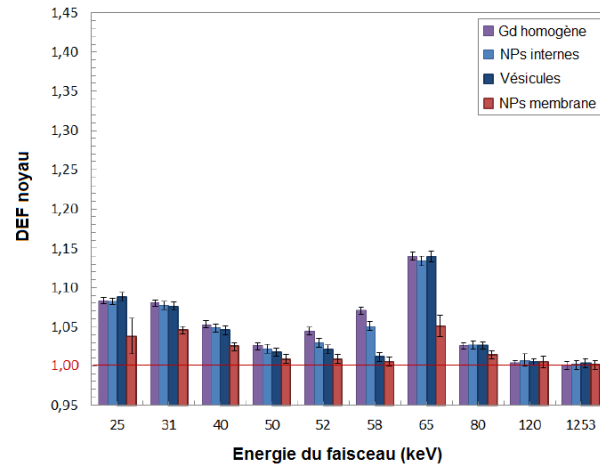
Les distributions de GdNPs (vésicules (Fig. 8.9(b)), cytoplasme (Fig. 8.9(c)) et membrane (Fig. 8.9(d))) ne conduisent pas aux mêmes DEFs que ceux calculés à partir d'un mélange homogène d'eau et de gadolinium (comparaison des figures 8.4 et 8.10). Le maximum de DEF se trouve maintenant à 65 keV lorsque les NPs sont dans le cytoplasme (quelque soit la distribution, homogène, vésicules ou NPs). A cette énergie, le fort taux de photo-électrons créés en couche K (et dont l'énergie est supérieure à ceux générés lors d'une irradiation à 51 keV), permet d'augmenter la quantité d'énergie déposée dans le noyau, conduisant à un DEF de 1.15 environ (cf. 8.10(a)).

Le DEF au cytoplasme est également maximal pour une énergie incidente de 65 keV (cf. 8.10(b)). Dans cette gamme d'énergies (juste au dessus du K-edge), la distribution homogène du gadolinium dans le cytoplasme est celle qui maximise la dose. Cela s'explique principalement par le fait que les électrons de très basse énergie ne sont pas ré-absorbés par les NPs. Ils comptent donc pour la dose déposée dans le cytoplasme même si leur parcours est très faible depuis le point d'interaction.

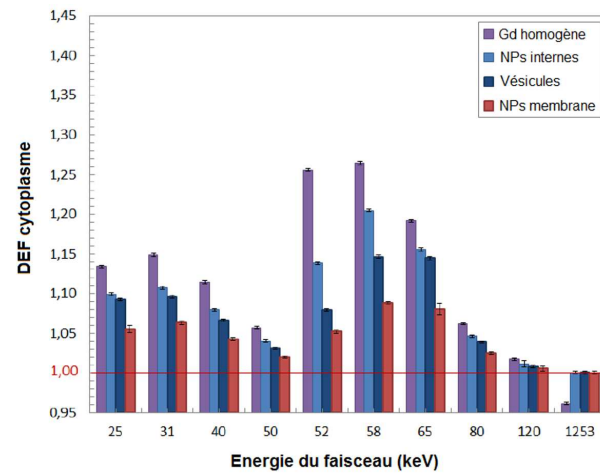
Le DEF à la membrane est quant à lui celui qui est le plus modifié par rapport au cas homogène considéré plus haut. Le maximum d'augmentation de la dose apparaît au dessus du K-edge du gadolinium (vers 58 keV) et tend vers une valeur supérieure à 1.4 lorsque le gadolinium est distribué sous forme de NPs de 100 nm réparties sur une fine couche autour de la membrane (cf. 8.10(c)). Cette forte augmentation du DEF est spécifique à cette distribution de gadolinium, ce qui confirme l'importance de la localisation des NPs pour exploiter le potentiel des électrons Auger de haut TEL. Enfin, il est également intéressant de noter que, quelque soit la région cellulaire (noyau, membrane ou cytoplasme) et la distribution des GdNPs considérées, le DEF calculé à haute énergie (1.25 MeV) est toujours non significativement différent de 1.0. Malgré les événements observés à l'échelle de la NP à cette énergie (cf. Fig. 8.7), les conséquences ne sont pas détectées à l'échelle de la cellule, dans le cadre de ces modélisations des phénomènes physiques. Ceci laisse penser que d'autres phénomènes chimiques ou biologiques, sont responsables des effets observés expérimentalement à haute énergie, comme dans l'étude de Jain *et al.* [Jain 10] ou de Mowat *et al.* [Mowa 11], que nous avons décrites à la section 4.2.3, p. 70.

8.3 Objectifs de l'étude

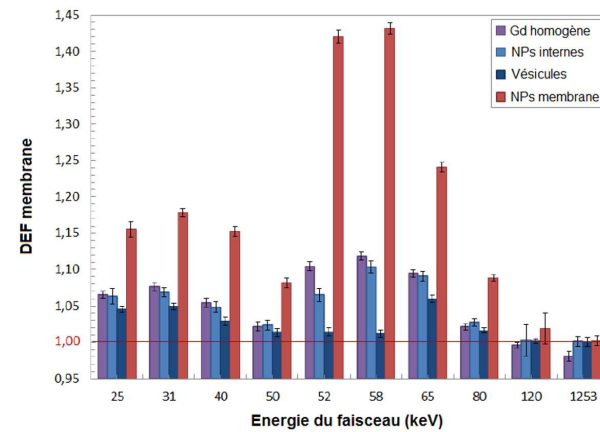
Les événements se produisant localement autour des NPs (à l'échelle sub-micrométrique) irradiées par des faisceaux de photons, sont importants et ont des conséquences en terme d'augmentation de dose à l'échelle de la cellule. Ces conséquences dépendent de la distribution subcellulaire des NPs, de leur taille ou de la taille des vésicules à l'intérieur desquelles elles peuvent être regroupées et de l'énergie des photons incidents. En accord avec les travaux de Lechtman *et al.*, l'ensemble des résultats obtenus par Rachel Delorme confirme que l'énergie des photons incidents doit être optimisée en fonction de la distribution subcellulaire des NPs pour augmenter la radio-toxicité de l'irradiation et qu'elle constitue en tout cas une piste d'investigation intéressante pour comprendre quelles cibles biologiques sont importantes pour une efficacité plus grande.



(a) DEF au noyau



(b) DEF au cytoplasme



(c) DEF à la membrane

FIGURE 8.10 – DEF calculés dans (a) le noyau, (b) le cytoplasme et (c) la membrane d'une cellule irradiée en présence de gadolinium homogène dans le cytoplasme (violet), distribué dans des lysosomes de 340 nm de diamètre (bleu foncé), distribué sous forme de GdNPs de 100 nm de diamètre aléatoirement réparties dans le cytoplasme (bleu clair) ou réparties en fine couche autour de la membrane (rouge) [Delo 13].

Les données de la littérature sur la radiosensibilisation induite par les NPs *in vitro* ne peuvent cependant pas toujours être corrélées à ces calculs. C'est le cas par exemple de la dépendance de la radiosensibilisation à la lignée cellulaire qui a été mise en évidence par *Jain et al.* Un effet positif a en effet été observé sur une lignée cancéreuse du sein (MDA-MB-231) irradiée en présence de AuNPs (1.9 nm, 12 μ M) pour différentes énergies de photons (160 kVp, 6 MV, 15 MV), alors qu'un même traitement ne provoquait aucune augmentation de la radiosensibilisation chez les cellules L132 et DU145 (cellules cancéreuses de prostate et cellules saines du sein respectivement) [*Jain 10*]. La différence entre radiosensibilisation et photoactivation prend ici tout son sens. Le terme de radiosensibilisant décrit l'ensemble des phénomènes qui augmentent l'effet des radiations. Certaines descriptions plus strictes limitent même le terme de radiosensibilisation aux augmentations des effets des radiations obtenues avec un composé absolument non-toxique au dosage considéré [*Nias 85*]. Les NPs ont tout à fait leur place dans cette famille mais nous ferons dans la suite, la distinction entre une augmentation des effets des radiations due à une augmentation de dose, qu'elle soit locale ou macroscopique, et une augmentation des effets des radiations due à d'autres mécanismes chimiques, biologiques, relatifs au métabolisme cellulaire par exemple. Les premiers seront qualifiés de "photoactivation" tandis que les seconds seront qualifiés de "radiosensibilisation". Le terme "radiotoxicité" englobera les différents phénomènes.

Les deux chapitres qui suivent ont pour but de présenter les études expérimentales réalisées en parallèle du travail théorique de *Rachel Delorme*, qui considèrent l'irradiation X des cellules tumorales F98 en présence des NPs de gadolinium, d'or et de platine décrites précédemment (cf. 5.2, p. 83). Les objectifs principaux de ce travail ont été :

- la quantification de la radiotoxicité induite par les nanoparticules sur les cellules F98.
- la comparaison de la radiotoxicité induite par les nanoparticules à celle induite par un agent de contraste.
- la compréhension des mécanismes responsables de l'augmentation de la radiotoxicité.

Le prochain chapitre présentera les méthodes expérimentales utilisées dans cette étude et le chapitre suivant détaillera quant à lui l'ensemble des résultats obtenus. La réponse cellulaire à une irradiation combinée a principalement été évaluée par test clonogénique. La localisation subcellulaire ainsi que l'énergie incidente des photons sont les deux principaux paramètres que nous avons fait varier afin de préciser la nature des effets observés. La réponse cellulaire inhérente aux GdNPs a été comparée à celle induite par une même quantité de gadolinium sous forme d'agent de contraste (Magnevist®). Cette molécule connue pour rester extracellulaire et répartie de manière homogène dans le milieu d'irradiation nous servira de point de comparaison pour discuter la radiosensibilisation induite par les NPs. Enfin, un essai pré-clinique a été conduit sur un modèle de rongeurs porteurs d'un gliome dans le but d'évaluer l'efficacité biologique des NPs dans le cadre d'un traitement de radiothérapie synchrotron.

Chapitre 9

Méthodes expérimentales pour mesurer l'augmentation de la radiotoxicité

Sommaire

9.1	Mesure de la production de radicaux libres OH^\bullet	142
9.2	Survie cellulaire et augmentation de la radiotoxicité	143
9.2.1	Les différentes sources de photons	143
9.2.2	Irradiation des cellules	144
9.2.3	Analyse de la survie cellulaire	147
9.3	Essais pré-cliniques	148
9.3.1	Inoculation des tumeurs cérébrales	148
9.3.2	Traitement des animaux	148
9.3.3	Analyse de la survie animale	150

Ce chapitre présente l'ensemble des méthodes que nous avons utilisées pour étudier la radiotoxicité induite par les nanoparticules sur le modèle F98 *in vitro* et *in vivo*. Cela comprend les méthodes de dosimétrie expérimentale, utilisées pour mesurer l'augmentation du taux de radicaux libres en présence d'atomes de gadolinium, ainsi que les protocoles d'irradiation cellulaire et d'essai pré-cliniques chez le rongeur porteur d'un gliome.

9.1 Mesure de la production de radicaux libres OH^\bullet

Il existe peu de méthodes de dosimétrie expérimentale permettant d'évaluer l'augmentation de dose due à un élément lourd. Nous avons cherché à évaluer une méthode chimique qui permet de mesurer le taux de production de radicaux libres dans une solution contenant du gadolinium. Par rapport aux gels dosimétriques de Fricke ou nPAG, le méthode proposée ici n'utilise pas l'imagerie par résonance magnétique, et peut donc considérer des éléments lourds aux propriétés magnétiques importantes, comme le gadolinium notamment.

Le taux de radicaux libres (OH^\bullet) a été mesuré avec l'irradiation d'une solution de deoxyadénosine (dAdo ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$) - 0.1 mM dans H_2O - 200 μL). En présence de radicaux libres OH^\bullet , cette molécule forme la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadénosine (8-oxo dAdo) qui est détectée par HPLC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry). Cette technique associe une analyse par chromatographie en phase liquide à une analyse par spectrométrie de masse. Le composé 8-oxo dAdo est séparé et sa quantité est mesurée en fonction de la dose de RX et en fonction de la concentration en gadolinium dans la solution. Le taux de radicaux libres produits par l'irradiation est directement proportionnel à l'intensité du pic de 8-oxo dAdo mesuré par HPLC-MS/MS. La figure 9.1(a) illustre la formation de la molécule 8-oxo dAdo en présence de OH^\bullet . La figure 9.1(b) représente les chromatogrammes correspondant à la mesure de 8-oxo dAdo en fonction de la dose de RX , mesurée dans l'eau, déposée dans une solution de dAdo (0.1 mM dans H_2O).

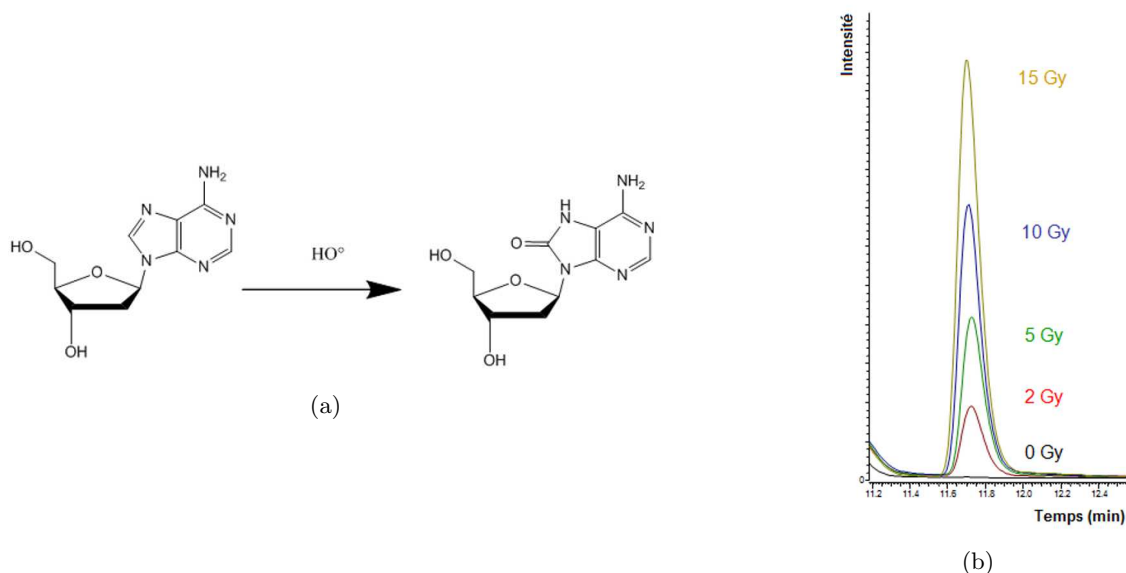


FIGURE 9.1 – (a) Réaction de formation de la molécule 8-oxo dAdo à partir de la molécule dAdo en présence de radicaux libres OH^\bullet . (b) Exemple de chromatogrammes obtenus par HPLC-MS/MS à partir d'une solution de dAdo (0.1 mM dans H_2O) irradiée à différentes doses.

Afin de mesurer l'augmentation du taux de radicaux libres produits en présence d'éléments lourds, du gadolinium sous forme de sels (GdCl_2) a été ajouté à la solution de dAdo (volume

total de 50 μL). Quatre concentrations différentes en sels ont été étudiées : 0, 2, 5 et 10 mg/mL (équivalentes à 0, 1.4, 3.5 et 6.9 mg/mL de gadolinium). Chaque solution a été irradiée à 0, 2, 5, 10 ou 15 Gy , pour trois énergies différentes : 49.5 keV (en dessous du K-edge du Gd), 51.0 keV (au dessus du K-edge du Gd) et 1.25 MeV (à haute énergie, où les sections efficaces du Gd et de l'eau sont proches). Les irradiations à 49.5 et 51.0 keV ont été réalisées avec le rayonnement synchrotron, tandis que les irradiations à 1.25 MeV ont été réalisées à l'aide d'une source de cobalt 60. Ces différentes sources de rayonnement sont décrites au paragraphe suivant.

Chaque irradiation est répétée trois fois. Pour chaque condition, la quantité moyenne de 8-oxo dAdo formée et son écart-type associé sont calculés. La pente relative à l'ajustement des valeurs en fonction de la dose d'irradiation est directement proportionnelle au taux de radicaux OH^\bullet créés dans la solution.

9.2 Survie cellulaire et augmentation de la radiotoxicité

Les cellules F98, précédemment décrites (cf. 5.1, p. 82), ont été utilisées pour étudier la survie cellulaire après une irradiation de photons en présence d'atomes lourds (que ce soit sous forme d'AC ou de NPs). La survie cellulaire a été évaluée par mesures clonogéniques selon le protocole 6.3.1, p. 93. Afin de mesurer la dépendance énergétique de l'effet radiosensibilisant, différentes sources de photons ont été utilisées pour irradier les cellules.

9.2.1 Les différentes sources de photons

Le synchrotron, et plus exactement, son faisceau de RX disponible sur la ligne médicale ID17. Le monochromateur de tomographie décrit à la page 47 est utilisé afin de sélectionner un faisceau monochromatique ($\Delta E < 100 \text{ eV}$) dans la gamme énergétique 25 - 110 keV . La sélection de l'énergie se fait grâce à l'orientation des cristaux monochromateurs. La calibration en énergie est réalisée grâce à la détection de l'intensité du rayonnement après un filtre connu (Iode ou Gadolinium par exemple), pour toute une plage d'orientations angulaires du cristal. Une fois le K-edge de l'élément repéré (diminution brutale de l'intensité du rayonnement détecté), l'orientation des cristaux du monochromateur peut être choisie de manière à sélectionner l'énergie souhaitée. La forte intensité de rayonnement primaire permet de conserver un débit de dose important (entre 1.2 et 6.0 Gy/min selon le mode de remplissage en électrons de la machine), malgré le caractère monochromatique du faisceau.

La source radioactive de Cobalt 60 a été utilisée afin de comparer la réponse obtenue au synchrotron à celle obtenue à plus haute énergie, dans la gamme du MeV (où l'effet photoélectrique est minoritaire par rapport à l'effet Compton et où le différentiel des sections efficaces relatives aux atomes lourds et aux atomes légers est négligeable). Elle possède deux raies d'émission γ à 1,1732 et 1,3325 MeV . L'énergie moyenne du faisceau est donc 1.25 MeV . Cet isotope est également émetteur β , mais les électrons, de plus faible parcours moyen, sont absorbés avant la cible (immergée, tout comme la source, dans une piscine d'eau) et ne comptent pas pour la dose délivrée. Le débit de dose est d'environ 1.2 Gy/min .

Le générateur de rayons X (GeneX) a ponctuellement été utilisé pour étudier la réponse cellulaire dans la gamme énergétique 10 à 200 keV , lorsque le caractère monochromatique n'était pas nécessaire. Cet irradiateur produit un spectre polychromatique de photons (200 kVp), dont

l'énergie moyenne peut être estimée à environ 50 keV, avec la filtration utilisée. La figure 9.2 illustre le spectre tel que nous l'avons utilisé et que nous avons tenté de mesurer au cours de ce travail. Le rayonnement étant trop intense pour le détecteur utilisé (semi-conducteur au Beryllium), des phénomènes de saturation limitent la précision des mesures (le pic à 130 keV sur la figure 9.2 indique une erreur de mesure relative à un phénomène de *pile-up* inhérent au détecteur). D'autres mesures sont prévues afin de préciser ce résultat. Le débit de dose à cette tension de polarisation est de 0.96 Gy/min.

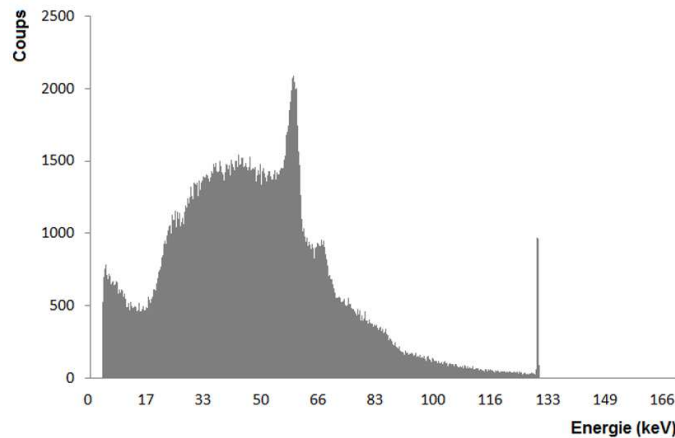


FIGURE 9.2 – Spectre du générateur de rayons X mesuré par un détecteur semi-conducteur au Béryllium. L'énergie moyenne du rayonnement est évaluée à environ 50 keV, mais des mesures complémentaires sont nécessaires pour préciser cette valeur.

9.2.2 Irradiation des cellules

Géométrie : Du fait de l'incidence horizontale du rayonnement synchrotron, les cellules peuvent difficilement être irradiées en adhérence sur leur support. Elles ont donc été trypsinées et mises en suspension dans du milieu de culture (contenant ou non un AC ou des NPs), dans un Eppendorf de 2 mL avant les irradiations. Le volume de milieu a été fixé à 400 μ L. Environ 100000 cellules ont été irradiées par conditions. Le volume de milieu est donc bien majoritaire dans l'échantillon par rapport au volume total des cellules (facteur 10^4). Un support dédié en PMMA¹ a été conçu afin d'irradier un maximum de cinq échantillons simultanément. La figure 9.3 représente ce support.

Dosimétrie : La dosimétrie est réalisée avec une chambre d'ionisation (PTW Semiflex ion chamber 31010 – 0.125 cm³) après chaque changement d'énergie. Le dosimètre est positionné dans l'air, selon la même géométrie que celle considérée pour l'irradiation des cellules. La dose délivrée est mesurée dans l'air et automatiquement convertie en dose dans l'eau. La mesure est également

1. PMMA est l'acronyme pour *Polymethyl Methacrylate*, qui est un composé polymère souvent utilisé comme équivalent tissu (en terme d'absorption des RX) pour les études dosimétriques dans la gamme d'énergies considérée.

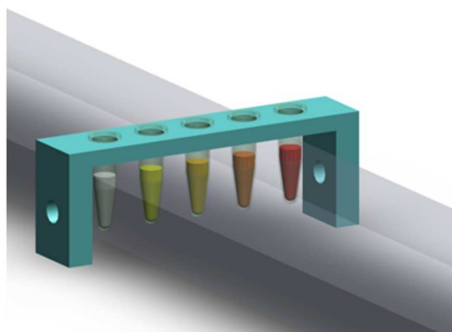


FIGURE 9.3 – Représentation du support utilisé pour l’irradiation des cellules F98 en suspension dans $400\ \mu\text{L}$ de milieu de culture contenant ou non des atomes lourds (AC ou NPs). Cinq échantillons au maximum peuvent être irradiés simultanément.

corrigée par le facteur k_{TP} qui corrige la réponse de la chambre des effets liés à la variation de la pression (P) et de la température (T) ambiantes par rapport aux température et pression spécifiées par le laboratoire officiel d’étalonnage.

$$k_{TP} = \frac{T \cdot P_0}{T_0 \cdot P} \quad (9.1)$$

T_0 et P_0 sont les température et pression de référence ($293.15\ \text{K}$ et $1013.25\ \text{hPa}$ respectivement).

Distributions subcellulaires des NPs au moment de l’irradiation : Différentes conditions d’irradiation ont été comparées. Les cellules exposées à des éléments lourds (que ce soit sous forme d’AC ou de NPs) sont irradiées selon la géométrie décrite ci-dessus. Leur réponse à une irradiation est comparée à celle des cellules contrôles (même irradiation, sans éléments lourds). Les tableaux 9.1 et 9.2 regroupent les conditions d’irradiation relatives au gadolinium d’une part et à l’or et au platine d’autre part. Pour chaque élément, les concentrations d’incubation, les temps d’incubation et les concentrations en éléments lourds présentes pendant l’irradiation sont indiqués.

Le Magnevist[®] est un agent de contraste contenant du gadolinium. Il est ajouté dans le milieu de culture juste avant l’irradiation des cellules et reste entre 10 et 15 *min* en présence des cellules, pendant les irradiations réalisées au synchrotron et au GeneX, et de l’ordre de 25 à 30 *min* pour les irradiations réalisées avec la source de cobalt (plus éloignée du laboratoire). Pendant cette période, il reste externe aux cellules.

Les NPs (Gd, Au et Pt) ont été décrites précédemment (cf. paragraphe 5.2, p. 83). Leurs toxicités ainsi que leurs localisations et concentrations subcellulaires après incubation ont été étudiées dans la partie précédente (cf. chapitre 7, p. 101). Les protocoles d’incubation choisis pour une association aux *RX*, n’augmentent pas la mort des cellules F98 lorsqu’ils sont réalisés seuls (cf. 7.1.1 et 7.2.2, p. 102 et 110 respectivement).

Dans le cas des GdNPs, trois distributions différentes ont été associées à l’irradiation, afin d’étudier

Élément	Magnevist®	GdNPs		
		(Externes)	(Adsorbées)	(Adsorbées+externes)
$C_{Incubation}$ (mg/mL)	-	-	2.1	
(NPs/mL)	-	-	$1.2 \cdot 10^{18}$	
$t_{Incubation}$ (h)	0	0	5	
Localisation	Externes	Externes	Membrane	Membrane + Externes
$C_{Irradiation}$	2.1, 5 ou 10 mg/mL	2.1 mg/mL	≈ 0.6 pg/cell	≈ 0.6 pg/cell + 1.6 mg/mL

TABLE 9.1 – Conditions d'irradiation des cellules F98 en présence de gadolinium sous différentes formes (NPs ou AC). $C_{Incubation}$ indique la concentration d'incubation (mg/mL ou NPs/mL), $t_{Incubation}$ indique le temps d'incubation (h), *Localisation* précise la localisation principale des éléments pendant l'irradiation et $C_{Irradiation}$ indique la concentration de gadolinium présente au moment de l'irradiation, en fonction de sa localisation subcellulaire.

Élément	AuNPs		PtNPs	
	peptide 1	peptide 3	peptide 1	peptide 3
$C_{Incubation}$ (mg/mL)	0.46		0.04	
(NPs/mL)	$1.6 \cdot 10^{12}$		$1.6 \cdot 10^{12}$	
$t_{Incubation}$ (h)	24		24	
Localisation	Cytoplasme		Cytoplasme	
$C_{Irradiation}$	≈ 0.6 pg/cell	≈ 0.7 pg/cell	$\approx 9.0 \cdot 10^{-3}$ pg/cell	$\approx 1.5 \cdot 10^{-2}$ pg/cell

TABLE 9.2 – Conditions d'irradiation des cellules F98 en présence de NPs d'or et de platine. $C_{Incubation}$ indique la concentration d'incubation (mg/mL ou NPs/mL), $t_{Incubation}$ indique le temps d'incubation (h), *Localisation* précise la localisation principale des éléments pendant l'irradiation et $C_{Irradiation}$ indique la concentration de NPs internalisée, au moment de l'irradiation.

la relation entre l'augmentation de la mort cellulaire et la localisation subcellulaire des NPs. Nous les avons qualifiées de GdNPs *externes*, GdNPs *adsorbées* et GdNPs *adsorbées+externes* dans la suite. Dans le premier cas, les GdNPs ont été ajoutées dans le milieu de culture juste avant l'irradiation. Dans le second cas, les cellules F98 ont été incubées pendant 5h en présence de GdNPs, puis le surnageant a été éliminé et remplacé par du milieu de culture vierge avant irradiation. Nous avons vu dans la partie précédente que ce traitement conduisait à l'adsorption des NPs majoritairement sur les membranes. Dans le troisième cas, les cellules ont été incubées de la même manière, puis irradiées dans le surnageant contenant l'excédent de NPs, de manière à ce que les GdNPs soient à la fois adsorbées et externes aux cellules.

Les Au et PtNPs ont quant à elles été associées au rayonnement après 24h d'incubation et rinçage des cellules avant irradiation. Nous avons vu dans la partie précédente qu'une telle incubation leur permet d'être internalisées dans le cytoplasme des cellules. Les concentrations internalisées ont été mesurées dans la partie 7.2.4, p. 113 et sont rappelées dans le tableau 9.2.

9.2.3 Analyse de la survie cellulaire

Calcul de la survie : Après irradiation, les cellules ont été remises en culture selon le protocole de clonogénicité décrit plus haut (cf. 6.3.1, p. 93). La survie cellulaire a été mesurée *via* le rapport du nombre de colonies de plus de 50 cellules formées 11 jours après irradiation, sur le nombre de cellules initialementensemencées. Chaque condition expérimentale a été répétée trois fois, de manière à calculer les survies moyennes brutes et normalisées (par la survie des cellules non irradiées ($\overline{S_{0Gy}}$)), \overline{S} et $\overline{S_{norm}}$ respectivement, et leurs écart-types associés. Les données expérimentales ont ensuite été ajustées par une fonction linéaire quadratique, dont la signification des paramètres α et β a été expliquée plus haut (cf. 2.3.4, p. 39) :

$$\overline{S_{norm}}(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (9.2)$$

où D représente la dose mesurée dans l'eau (Gy).

Le ratio α/β donne une indication de la complexité des dommages radio-induits (cf. partie 2.3.4, p. 39). Ces coefficients ont été extraits des ajustements et comparés pour les différentes localisations de NPs (décrites dans les tableaux 9.1 et 9.2).

Calcul du facteur d'augmentation de sensibilité : Dans la littérature, le facteur d'augmentation de sensibilité (ou *SER*, pour *Sensitive Enhancement Ratio*) induite par la présence d'éléments lourds pendant l'irradiation est très souvent estimé comme le rapport des doses conduisant à une survie cellulaire donnée sans et avec l'élément lourd : taux de survie souvent fixé à 10 ou 50%. Pour réaliser cette mesure, il est nécessaire de connaître $\overline{S}(D)$ dans une large gamme de doses (D), comprenant la valeur $\overline{S}(D) = 0.1$ (ou 0.5) choisie. Dans notre cas, afin d'optimiser les temps de faisceau synchrotron, une seule dose de rayonnement a été considérée pour les expériences relatives à la dépendance énergétique de l'augmentation de sensibilité. Le *SER* a été calculé non pas à partir du rapport des doses pour une survie donnée, mais à partir du rapport des survies des cellules irradiées en présence ou sans atomes lourds, pour une dose donnée (4 Gy). La valeur 4 Gy a été choisie pour le compromis qu'elle offre entre une dose trop faible (1, 2 Gy) où les effets sont souvent variables entre les cellules et une dose trop forte (7, 8 Gy) où des effets contradictoires peuvent apparaître (principalement à cause d'aberrations chromosomiques apparues chez les cellules survivantes).

$$SER_{4Gy} = \frac{\overline{S}_{4Gy, [AtomesLourds]=0}}{\overline{S}_{4Gy, [AtomesLourds]>0}} \quad (9.3)$$

L'erreur associée au SER_{4Gy} a été estimée par l'écart-type relatif aux trois répétitions de la mesure. Un SER_{4Gy} égal à 1 indique que la présence d'atomes lourds n'augmente pas la mort radio-induite des cellules. A l'inverse, un SER_{4Gy} supérieur à 1 indique une augmentation de l'efficacité des rayonnements en présence d'éléments lourds.

Les mesures du SER_{4Gy} seront comparées au *DEF* macroscopique calculé par simulations Monte-Carlo, en fonction de l'énergie des photons incidents. Cette comparaison est essentielle pour définir la nature de l'augmentation de la mort cellulaire en présence d'atomes lourds. Si elle est uniquement due à l'augmentation de dose physique, l'évolution du *SER* en fonction de l'énergie devrait être comparable à celle du *DEF*. Sinon, cela laisse supposer que d'autres mécanismes de radiosensibilisation, différents de la photoactivation des atomes lourds, entrent en jeu.

9.3 Essais pré-cliniques

Les nanoparticules d'or (AuNPs *peptide 1* ou *3*) ont été utilisées en combinaison à un traitement de radiothérapie synchrotron dans le but d'évaluer leur efficacité thérapeutique chez le rat porteur d'un gliome F98.

9.3.1 Inoculation des tumeurs cérébrales

Les expériences ont été réalisées sur des rats Fischer mâles syngéniques, âgés de 7 à 8 semaines et pesant entre 220 et 240 g à leur arrivée au laboratoire (*Charles Rivers Laboratories*, L'Arbresle, Rhône, France). Avant toute intervention chirurgicale, les rats sont anesthésiés par une brève inhalation d'isoflurane suivie d'une injection intrapéritonéale d'une solution de Xylazine 25% et de Kétamine 40%, dans de l'eau pour préparations injectables (0.2 mL /100 g de rat). Ce protocole permet d'induire une anesthésie générale pendant 2 à 3h.

Environ une semaine avant l'implantation des tumeurs, les cellules F98 sont cultivées selon le protocole décrit précédemment 6.2.1, p. 92. Le jour de l'implantation, elles sont trypsinées, centrifugées, comptées puis diluées à la concentration précise de 250000 *cellules/mL* dans du DMEM supplémenté en antibiotiques (1%). Un mL de cette solution est à nouveau centrifugé, le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans une solution de DMEM contenant 1.3% d'agarose (*UltraPureTM* Low Melting Point Agarose). La poudre d'agarose est au préalable dissoute dans du DMEM chauffé à 70°C, puis la solution est refroidie à 37°C pour reprendre les cellules.

1000 cellules F98 (*i.e* 4 μ L de solution) sont implantées de manière stéréotaxique dans le noyau caudé droit des rats, selon le protocole décrit par *Benabid et al.* [Bena 86]. L'animal est placé dans un cadre de stéréotaxie (Kopf Instrument, cf. Fig 9.4(a)). Le point d'injection est repéré par rapport aux coordonnées du bregma², à 3.5 mm à droite de celui-ci. Une fine trépanation permet d'injecter 4 μ L de solution contenant 1000 cellules, à un débit de 10 μ L/min. L'injection est réalisée à l'aide d'une seringue Hamilton 26sG (1701SN), insérée dans le tissu cérébral à la profondeur de 6 mm, puis remontée de 0.5 mm pour faire une poche à l'intérieur de laquelle les cellules sont déposées. Le biseau de l'aiguille est toujours orienté vers le côté droit de l'animal. Après l'injection, la seringue est lentement remontée et le trou percé dans l'os est comblé par de la cire à os. La plaie est désinfectée puis suturée. La figure 9.4(b) représente la position d'implantation des cellules de gliomes dans le cerveau de l'animal.

9.3.2 Traitement des animaux

Imagerie des tumeurs par IRM : Afin de vérifier la présence des tumeurs avant la thérapie, les animaux sont imagés par IRM. Une séquence anatomique pondérée en T2 ($TR = 4000$ ms, $TE = 33$ ms, *matrice* = 256×256) est réalisée 13 jours après l'implantation des cellules tumorales, sur un aimant de 4.7 T. Les animaux sont sous anesthésie générale (inhalation continue d'Isoflurane) pendant l'acquisition. La figure 9.5(a) représente une image T2 du cerveau d'un animal, au centre de sa tumeur, à J13. La figure 9.5(b) illustre la distribution des volumes tumoraux à J13 entre les différents animaux. La taille de la tumeur est estimée à partir de l'aire tumorale sur la coupe

2. Le bregma correspond à la jonction des sutures coronale et sagittale des os de la partie supérieure du crâne.

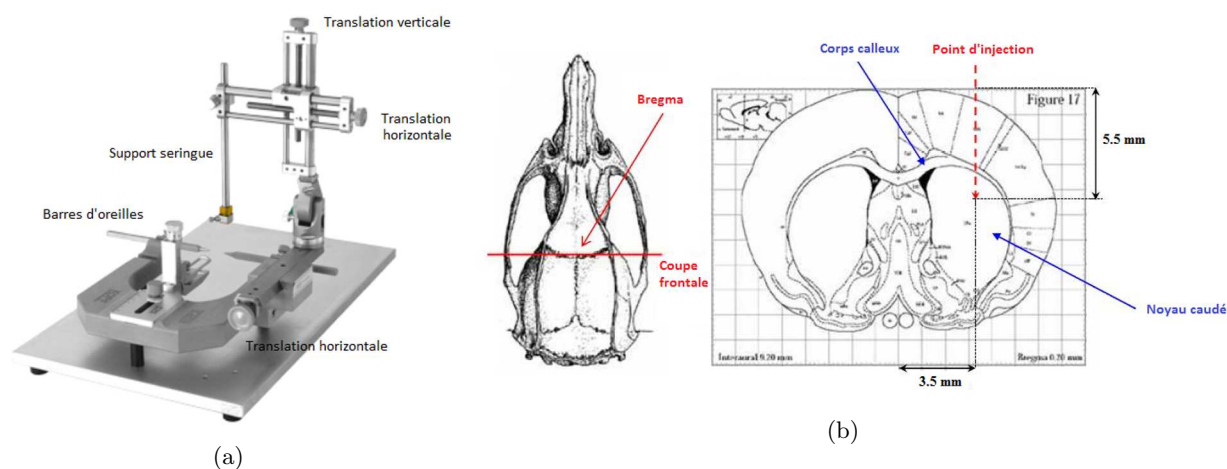


FIGURE 9.4 – a) Cadre de stéréotaxie utilisé pour implanter les cellules tumorales. b) Position du point d'injection des 1000 cellules tumorales dans le noyau caudé de l'animal. L'aiguille est d'abord insérée à 6 mm de profondeur puis remontée à 5.5 mm par rapport à la surface de la boîte crânienne. L'aiguille est décalée de 3.5 mm à droite du bregma.

centrale (mm^2). Les animaux sont répartis dans les différents groupes de traitements de manière équilibrée en fonction du volume de leur tumeur. Le tableau 9.3 précise les différents groupes de thérapie.



FIGURE 9.5 – (a) Coupe axiale du cerveau d'un animal malade, au centre de sa tumeur. L'image est acquise par IRM (séquence pondérée en T2). (b) Distribution de l'aire tumorale imagées par IRM à J13.

Injection des AuNPs : Seules les NPs d'or (*peptide 1* et *peptide 3*) ont été utilisées *in vivo* pour un essai thérapeutique. Elles ont été injectées localement, aux mêmes coordonnées que celles du point d'injection des cellules tumorales, par la méthode de CED dont le principe a été décrit au paragraphe 1.2.6, p.13 et le protocole expérimentale, au paragraphe 6.5, p.99. 10 μL de AuNPs

Groupes	Nombre d'animaux
Contrôles	5
AuNPs (<i>peptide 1</i>)	5
AuNPs (<i>peptide 3</i>)	5
X	5
AuNPs (<i>peptide 1</i>) + X	8
AuNPs (<i>peptide 3</i>) + X	7

TABLE 9.3 – Nombre d'animaux pour chaque groupe de traitements. Les trois premiers groupes représentent les animaux non irradiés, ayant reçu ou non une injection intracérébrale de NPs. Les trois derniers groupes représentent les animaux traités par radiothérapie, en combinaison ou non à l'injection de NPs.

($1.52 \mu\text{g/mL}$, $0.5 \mu\text{L/min}$) ont été injectés 13 jours après l'implantation des tumeurs (environ 24h avant l'irradiation), juste après l'imagerie IRM, une fois que les groupes de traitement ont été définis. La cytotoxicité d'une telle injection avait au préalable été mesurée et trouvée comme étant nulle (cf. 7.3, p.117).

Radiothérapie : Environ 24h après l'injection des NPs (*i.e.* 14 jours après l'inoculation des tumeurs), les animaux ont à nouveau été anesthésiés. Ils ont été positionnés sur un support dédié qui maintient leur tête en position fixe et verticale par rapport à l'incidence du faisceau de photons. La radiothérapie a été réalisée avec un rayonnement monochromatique de 81.0 keV (300 eV au dessus du K-edge de l'or) et collimaté (8 mm de large et 10 mm de haut). Les coordonnées ont été repérées sur un premier scan radiographique. Le centre du faisceau a été aligné sur le centre de la tumeur. Cinq incidences ont été choisies : 60° , 140° , 180° , 260° et 340° , de manière à délivrer 3 Gy à la position de la tumeur ($\approx 1.5 \text{ cm}$ de profondeur) sur chacune. Une dose totale de 15 Gy à la tumeur a ainsi été délivrée chez les animaux des groupes recevant la radiothérapie. La dosimétrie a été réalisée avant la radiothérapie à l'aide d'une chambre d'ionisation (PTW Semiflex ion chamber 31010 – 0.125 cm^3).

Mesure de la survie animale : Après la radiothérapie, le comportement et l'état physique des animaux a été régulièrement suivi. Ils ont été pesés tous les jours. Une perte de poids importante et l'apparition de signes d'ataxie³ et chromodacryorrhée⁴ sont caractéristiques d'une mort proche [Yang 97]. Lorsque ces signes apparaissent, les animaux sont euthanasiés par une anesthésie générale (par inhalation d'Isoflurane) suivie d'une injection cardiaque de Doléthal® (0.2 mL).

9.3.3 Analyse de la survie animale

La survie des animaux est représentée sous forme d'une courbe de Kaplan-Meier, où le nombre d'animaux vivants est représenté en fonction du jour après inoculation des tumeurs. Le taux de survie est ainsi réactualisé à chaque évènement (un évènement indique un décès) ce qui donne un aspect en marches d'escalier à la courbe. La survie moyenne (\bar{S}) indique le nombre moyen de jours

3. L'ataxie est un trouble moteur non paralytique caractérisé par une mauvaise coordination des mouvements.

4. La chromodacryorrhée correspond à une sécrétion de liquide rouge au niveau des yeux et du nez, que l'on confond avec du sang.

de vie des animaux. La médiane de survie (MeS) indique quant à elle le jour pour lequel 50% des animaux du groupe considéré sont toujours en vie. Enfin, le pourcentage d'augmentation de survie ($\%ILS$, pour Increase in Life Span) est calculé relativement au groupe d'animaux contrôles (non traités) :

$$\%ILS = \frac{|S_{controle} - S_{traitement}|}{S_{controle}} \times 100 \quad (9.4)$$

La différence de survie entre deux traitements a été évaluée par le test statistique de Log-Rank qui est particulièrement bien adapté à la comparaison de l'efficacité d'un nouveau traitement par rapport à un traitement contrôle connu. Ce test se base sur une hypothèse nulle (H_0) considérant qu'il n'y a pas de différence entre les deux groupes [Blan 04]. Les événements (mort d'un animal) des différents groupes sont ensuite comparés pour chaque temps t_i que dure l'étude. Le tableau récapitulatif représenté ci dessous peut alors être construit (cf. Tab. 9.4) :

	Nb. Évènements	Nb. Survivants
Groupe 1	d_{1i}	n_{1i}
Groupe 2	d_{2i}	n_{2i}
Somme	d_i	n_i

TABLE 9.4 – Tableau permettant de comparer des traitements 1 et 2 l'un par rapport à l'autre par le test statistique de Log-Rank. i représente l'indice de temps pour lequel on regarde les événements d et le nombre de survivants n .

d_i et n_i indiquent le nombre de décès et de survivants au temps t_i respectivement. L'interruption de l'étude avant l'apparition de l'évènement (avant la mort d'un individu) ou la perte (de vue) d'un "patient" sont les deux phénomènes qui peuvent biaiser l'analyse. Dans notre cas, aucun de ces biais n'intervient.

Sous hypothèse nulle (H_0), le nombre d'évènements attendus au temps t_i dans le groupe 1, est une variable aléatoire, distribuée selon une loi hypergéométrique d'espérance :

$$e_{1i} = n_{1i} \frac{d_i}{n_i} \quad (9.5)$$

et de variance (identique pour les groupes 1 et 2) :

$$v_i = \frac{d_i(n_i - d_i)n_{1i}n_{2i}}{n_i^2(n_i - 1)} \quad (9.6)$$

Les variables aléatoires qui correspondent au nombre d'évènements attendus sous H_0 peuvent être considérées comme indépendantes. Elles suivent alors une loi du χ^2 à un degré de liberté.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^k d_{1i} - \sum_{i=1}^k e_{1i}}{\sum_{i=1}^k v_i} = \frac{\sum_{i=1}^k d_{2i} - \sum_{i=1}^k e_{2i}}{\sum_{i=1}^k v_i} \quad (9.7)$$

La valeur de χ^2 est comparée à une valeur seuil indiquant une certaine probabilité de rejet de l'hypothèse nulle. Tout comme pour le test de Student, cette probabilité doit être fixée au préalable. Dans notre étude, nous choisirons un critère de signification à 0.05.

Chapitre 10

Nanoparticules et rayons X : Réponses cellulaire et tumorale

Sommaire

10.1	Combinaison d'un agent de contraste à une irradiation X	154
10.1.1	Dosimétrie par mesure des radicaux libres OH^\bullet	154
10.1.2	Effet sur la survie cellulaire	156
10.2	Radiosensibilisation des cellules F98 par les NPs de gadolinium	159
10.2.1	Toxicité du gadolinium libre	160
10.2.2	Dépendance de la radiotoxicité en fonction de la dose de rayons X	160
10.2.3	Dépendance de la radiotoxicité en fonction de l'énergie des rayons X	162
10.3	Radiosensibilisation des cellules F98 par les NPs d'or et de platine	165
10.3.1	Réponse cellulaire	166
10.3.2	Réponse tumorale	169
10.4	Conclusion	171

10.1 Combinaison d'un agent de contraste à une irradiation X

Dans cette première partie, la combinaison d'un élément lourd distribué de manière homogène dans un milieu et d'une irradiation de photons (hautes et basses énergies) est étudiée en termes d'augmentation de la production de radicaux libres et d'augmentation de mort cellulaire. Cette étude a été réalisée dans le but de pouvoir ultérieurement, comparer la combinaison RX/NPs à un effet plus classique (RX/AC).

10.1.1 Dosimétrie par mesure des radicaux libres OH^\bullet

Le taux de radicaux libres OH^\bullet a été mesuré dans une solution contenant ou non des sels de gadolinium ($GdCl_2$) à différentes concentrations (0.0, 1.4, 3.5 et 6.9 $mg\ Gd/mL$), irradiées à différentes doses et pour trois énergies de photons différentes : 49.5, 51.0 et 1253 keV , en dessous, au dessus du K-edge du gadolinium et à haute énergie respectivement. Le détail du protocole expérimental est donné au paragraphe 9.1, p. 142. Nous retiendrons ici que les doses mentionnées sont toujours les doses mesurées dans l'eau, ne tenant pas compte de la présence du gadolinium. Le graphe 10.1 représente la quantité de 8-oxo dAdo formée, proportionnelle au taux de radicaux libres OH^\bullet générés pendant l'irradiation, en fonction de la dose déposée dans la solution et pour les différentes concentrations de gadolinium.

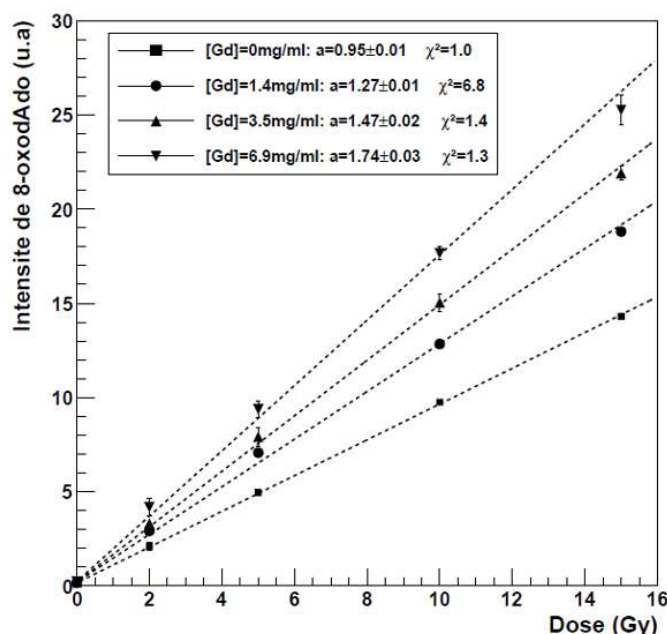
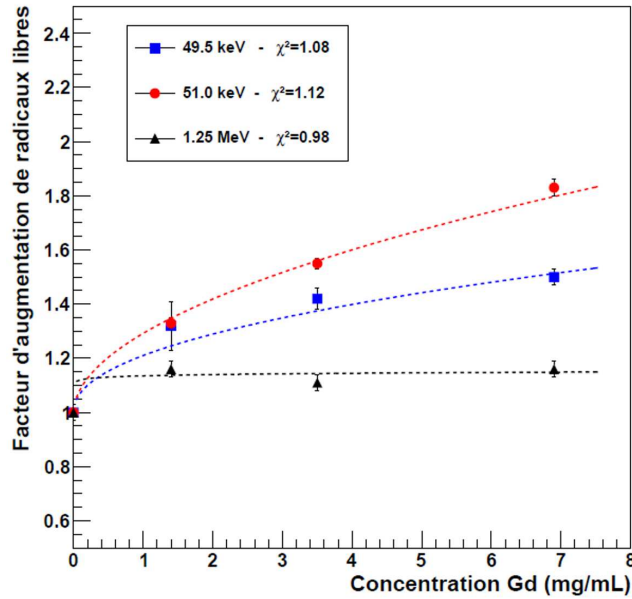


FIGURE 10.1 – Quantité de 8-oxo dAdo formée, proportionnelle au taux de radicaux libres OH^\bullet créés pendant l'irradiation, en fonction de la dose pour une irradiation à 51 keV . La dose indiquée correspond à une mesure dans l'eau.

Pour chaque concentration de gadolinium considérée, le taux de radicaux libres créés augmente linéairement avec la dose déposée dans la solution. Le coefficient directeur a des ajustements

linéaires, indique l'amplitude de l'effet. Ce coefficient a été extrait pour l'ensemble des données (aux trois énergies d'irradiation) afin d'étudier la relation entre l'augmentation de la production de radicaux libres et la concentration de gadolinium. Les rapports des pentes obtenues avec et sans gadolinium sont représentés sur la figure 10.2. Cela permet d'évaluer l'effet induit par la présence du gadolinium de façon équivalente à un DEF.



(a)

Énergie	Ajustement ($\alpha.C^n + 1$)	
	α	n
49.5 keV	0.21 ± 0.01	0.46 ± 0.03
51.0 keV	0.29 ± 0.01	0.52 ± 0.01
1.25 MeV	0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.25

(b)

FIGURE 10.2 – (a) Augmentation du taux de radicaux libres OH^\bullet créés pendant l'irradiation d'une solution d'eau et de gadolinium en fonction de la concentration en gadolinium et pour trois énergies de photons incidents : 49.5 keV, 51.0 keV et 1.25 MeV. Les données expérimentales ont été ajustées par une fonction $(\alpha.C^n + 1)$ dont les paramètres sont regroupés dans le tableau (b).

Contrairement à l'augmentation de dose (DEF, cf. Fig. 8.2(b)), l'augmentation du taux de radicaux libres n'est pas linéaire avec la concentration en gadolinium (dans la gamme de concentrations 0-7 mg/mL considérée), mais suit une loi de puissance $(\alpha.C^n + 1)$ qui indique un phénomène de saturation. Ce phénomène a deux explications possibles :

- Les radicaux OH^\bullet se recombinent partiellement avec les sels de gadolinium.
- Les radicaux OH^\bullet se recombinent partiellement entre eux.

La première possibilité est exclue puisque la recombinaison de GdCl_2 avec OH^\bullet n'est pas possible. La seconde hypothèse semble plus probable bien que la probabilité de recombinaison entre deux OH^\bullet ne soit pas très élevée. Cependant, plus la concentration en Gd est importante, plus le taux de OH^\bullet créés localement autour des atomes de gadolinium est grand, et la probabilité de combinaison $\text{OH}^\bullet/\text{OH}^\bullet$ augmente en conséquence. Cela peut expliquer la saturation observée.

La dépendance du facteur d'augmentation des radicaux libres à l'énergie des photons incidents est également bien marquée sur le graphe 10.2. Si l'on considère par exemple le facteur d'augmenta-

tion des radicaux libres aux différentes énergies pour une concentration en gadolinium de 2 mg/mL (concentration qui servira par la suite de référence pour la comparaison aux GdNPs), on observe un écart important entre les irradiations réalisées en dessous et au dessus du K-edge du gadolinium. Le taux de OH^\bullet augmente de 42% par rapport au taux produit dans de l'eau à 51.0 keV et de seulement 27% lorsque les irradiations sont réalisées à 49.5 keV (données issues des ajustements). Cette différence importante entre ces énergies très proches ne peut qu'être due à l'augmentation de dose physique significative de part et d'autre du K-edge (cf. Fig. 8.2). Ce résultat est en accord avec les simulations qui montrent que le gadolinium distribué de manière homogène dans de l'eau augmente la dose physique déposée dans le milieu.

A haute énergie (1.25 MeV), on observe une légère augmentation du facteur d'augmentation de radicaux libres, de l'ordre de 10%. Cependant, cet effet ne dépend pas de la concentration en gadolinium, ce qui laisse penser que ces observations ne sont pas dues à l'augmentation de dose inhérente à la présence des atomes lourds dans le milieu. Nous n'avons aujourd'hui, pas d'explication pour interpréter ce phénomène. Des expériences complémentaires sont prévues afin d'expliquer cet offset.

10.1.2 Effet sur la survie cellulaire

Afin de vérifier que la présence de Magnevist[®] dans le milieu de culture des cellules F98 pendant le temps nécessaire à l'irradiation n'a pas d'influence sur leur survie, la survie clonogénique a été mesurée après l'exposition à différentes concentrations d'AC, sans irradiation. Le temps d'exposition a été fixé à 15 minutes (temps nécessaire au traitement des cellules lorsqu'elles sont irradiées) et la concentration en gadolinium, entre 0 à 50 mg/mL . Le tableau 10.1 regroupe les valeurs de survies brutes et leurs écart-types. Aucune différence significative de survie n'a été observée par rapport aux contrôles, quelque soit la concentration en gadolinium ($p > 0.05$ pour toutes les conditions).

Concentration en Magnevist [®] (mg/mL)	Survie \pm SD
0	0.58 ± 0.08
1	0.56 ± 0.08
2	0.61 ± 0.06
5	0.57 ± 0.09
10	0.57 ± 0.05
20	0.57 ± 0.06
50	0.61 ± 0.07

TABLE 10.1 – Survies moyennes \pm SD (non normalisées) des cellules F98 exposées à différentes concentrations de Magnevist[®], après 15 min d'exposition.

La figure 10.3(a) représente les courbes de survie pour différentes concentrations de Magnevist[®] (0.0, 2.1, 5.0 et 10.0 mg/mL). Les données expérimentales ont été ajustées par une fonction linéaire quadratique (LQ) dont les paramètres α et β (décrits plus haut - cf. 2.3.4, p. 39) ont été consignés dans le tableau 10.3(c).

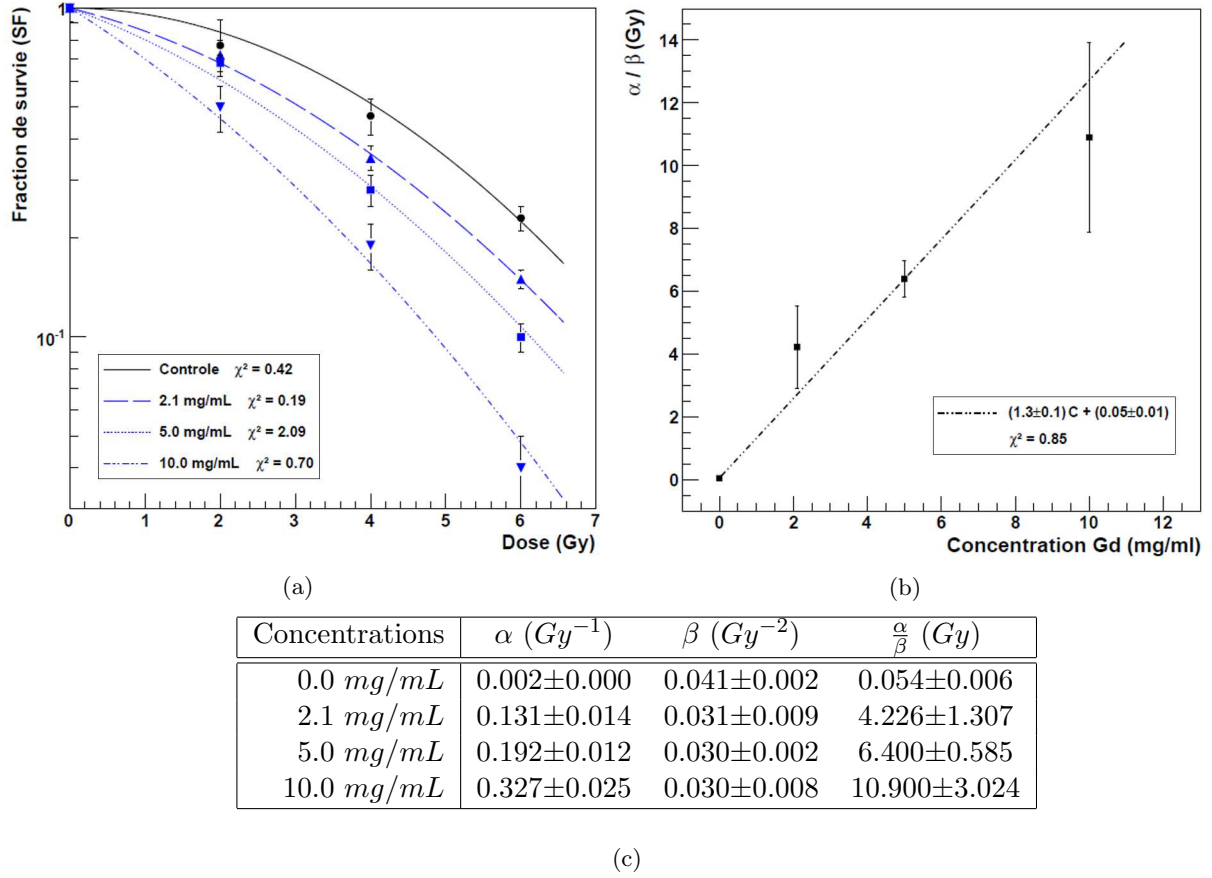


FIGURE 10.3 – (a) Survie des cellules F98 irradiées en suspension, à 51 keV, en présence de différentes concentrations de Magnevist® (0.0, 2.1, 5.0 et 10.0 mg/mL) distribué de manière homogène dans le milieu de culture. Les paramètres des ajustements des données expérimentales par le modèle LQ ($\exp(-\alpha.D - \beta.D^2)$) sont regroupés dans le tableau (c). La dose D exprimée ici correspond à une dose mesurée dans l'eau. Les rapports α/β sont représentés en fonction de la concentration en Gd sur la figure (c).

En association à une irradiation X, l'augmentation de dose inhérente à la présence du gadolinium dans le milieu entraîne une diminution de la survie des cellules F98 par rapport à une irradiation contrôle (sans gadolinium). Le rapport α/β donne une indication sur la complexité des dommages de l'ADN (cf. partie 2.3.4, p. 39). Un rapport important (de l'ordre de 10) indique des lésions létales d'emblée, c'est à dire des dommages sévères non réparables. Un rapport plus petit (de l'ordre de 3) indique des dommages plus simples et plus facilement réparables par les cellules. Dans notre étude, le rapport α/β augmente linéairement avec la concentration en Magnevist®. La figure 10.3(b) illustre la linéarité entre les deux grandeurs. L'augmentation de la dose inhérente à la présence du gadolinium, entraîne une augmentation du nombre de dommages cellulaires que l'on mesure ici *via* le rapport α/β extrait des données expérimentales : 0.05 ± 0.01 Gy pour les cellules contrôles *versus* 4.2 ± 1.3 , 6.4 ± 0.6 et 10.9 ± 3.0 Gy pour les cellules irradiées en présence de 2.1, 5.0 et 10.0 mg/mL de Magnevist® respectivement. La survie cellulaire en est directement affectée comme le montre les courbes de survie sur la figure 10.3(a).

Afin de quantifier l'augmentation de la mort cellulaire sur une gamme de concentrations plus étendue, le facteur d'augmentation de sensibilité (SER_{4Gy} , défini au chapitre précédent 9.2.3, p. 147) a été calculé pour différentes concentrations de Magnevist® (entre 0 et 50 mg/mL) associées à une irradiation de 4 Gy (mesurée dans l'eau) réalisée avec le générateur de rayons X décrit plus haut (cf. section 9.2.1, p.143). La figure 10.4 décrit la relation entre le SER_{4Gy} et la concentration en atomes lourds. La mort cellulaire augmente linéairement avec la concentration en gadolinium sur une large gamme de concentrations (0, 50 mg/mL). Ce résultat ne peut être comparé qu'avec prudence au DEF macroscopique calculé pour la même gamme de concentrations et représenté sur la figure 8.2(b). En effet, le spectre énergétique de l'irradiateur utilisé expérimentalement n'étant pas précisément connu, les DEF n'ont pas été calculés tout à fait dans les mêmes conditions. Cependant, la survie cellulaire semble fortement liée à l'augmentation de dose moyenne dans le milieu irradié, dans le cas du Magnevist®.

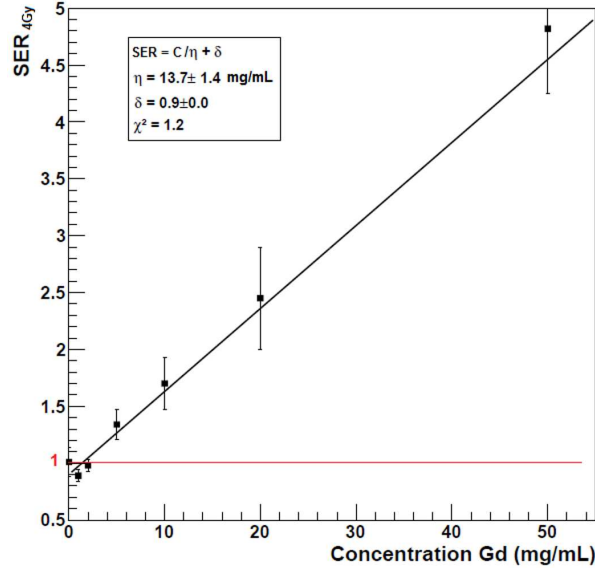


FIGURE 10.4 – SER_{4Gy} en fonction de la concentration en gadolinium présente dans le milieu d'irradiation. Les cellules F98 ont été irradiées à l'aide du générateur de rayons X (200 kVp, 4 Gy).

La figure 10.5 permet finalement de comparer l'augmentation de la mort cellulaire induite par la présence de 2.1 mg Gd/mL (sous la forme de Magnevist®), à l'augmentation de dose (DEF) calculée par simulation Monte Carlo à l'échelle macroscopique, en fonction de l'énergie des photons incidents. Les deux quantités (SER_{4Gy} et DEF) ne représentant pas les mêmes grandeurs, nous ne pouvons pas les comparer de manière absolue. Seule la tendance en fonction de l'énergie des photons incidents peut être comparée. Cette dépendance énergétique est tout à fait semblable pour les deux grandeurs (DEF/SER_{4Gy}). Pour la concentration de Gd considérée (2.1 mg/mL), l'amplitude du saut du K-edge vaut : $DEF_{49.5keV} = 1.162 \pm 0.002$ et $DEF_{51keV} = 1.284 \pm 0.002$ et $SER_{4Gy,49.5keV} = 1.14 \pm 0.20$ et $SER_{4Gy,51keV} = 1.31 \pm 0.10$. A haute énergie (1.25 MeV), la présence du gadolinium n'augmente ni la dose ($DEF_{1.25MeV} = 1.002 \pm 0.002$), ni la radiotoxicité

($SER_{4Gy,1.25MeV} = 1.02 \pm 0.13$). L'effet induit par le Magnevist[®] peut donc être entièrement attribué à la photoactivation du gadolinium.

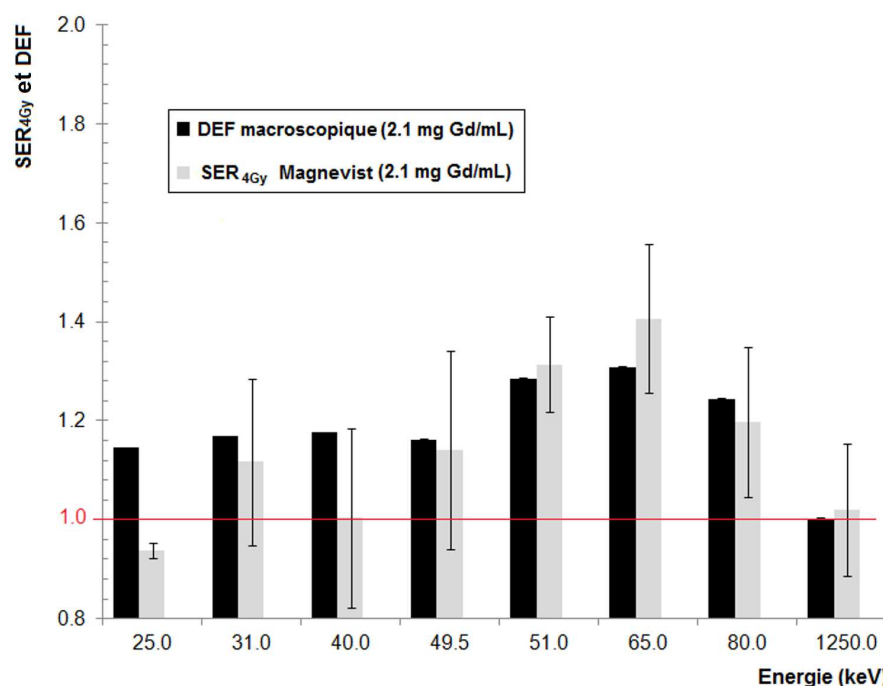


FIGURE 10.5 – DEF macroscopique simulé (noir) et SER_{4Gy} mesuré expérimentalement en présence de 2.1 mg/mL de gadolinium. Les cellules F98 ont été irradiées par des photons de différentes énergies entre 31 keV et 1.25 MeV.

10.2 Radiosensibilisation des cellules F98 par les NPs de gadolinium

Les nanoparticules de gadolinium (GdNPs) décrites précédemment (cf. chapitre 5.2, p.83) ont été utilisées en combinaison à un rayonnement de photons dans le but d'augmenter la radiotoxicité de l'irradiation. Dans cette étude, nous avons tenté de répondre à plusieurs questions :

- L'irradiation conduit-elle à une libération d'atomes de gadolinium libres, potentiellement toxiques pour les cellules ?
- La forme "nanoparticules" fait-elle une différence en terme de radiotoxicité par rapport à l'agent de contraste gadolinium ?
- La localisation subcellulaire (adsorbées sur les membranes ou non) des GdNPs au moment de l'irradiation a-elle une influence sur la survie cellulaire ?
- La radiotoxicité du traitement dépend-elle de l'énergie des photons ?

10.2.1 Toxicité du gadolinium libre

Le gadolinium libre est connu pour être toxique *in vitro* et *in vivo*, c'est pour cela que son utilisation clinique ou pré-clinique nécessite un assemblage moléculaire bien particulier. Afin de vérifier que l'irradiation des GdNPs ne libérait pas d'atomes de gadolinium toxiques pour les cellules F98, une solution de GdNPs (2.1 mg Gd/mL) a été irradiée (4 Gy , 200 kVp) et aussitôt mise au contact de cellules F98, pour une incubation de 30 min , 2 h ou 5 h à 37°C . Après l'incubation, les cellules F98 ont été rincées, puis utilisées pour mesurer leur survie clonogénique. La figure 10.6 représente la survie normalisée des cellules F98 incubées pendant 30 min , 2 h ou 5 h en présence de GdNPs irradiées ou non.

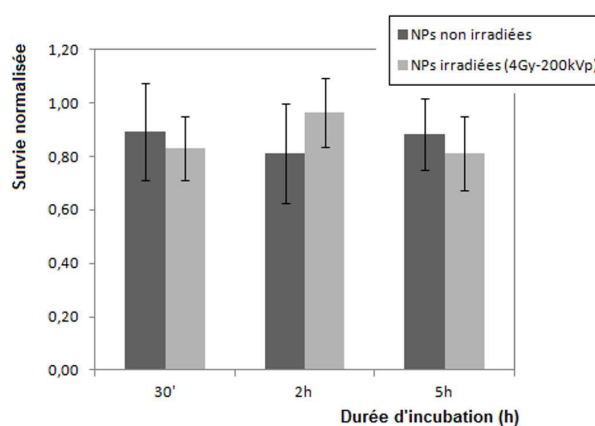


FIGURE 10.6 – Survie normalisée (par la condition contrôle) des cellules F98 exposées à des GdNPs non irradiées (gris clair) ou irradiées (4 Gy , 200 kVp) (gris foncé), pendant 30 min , 2 h ou 5 h à 37°C .

Aucune différence significative n'a été observée entre la survie des cellules contrôles (non incubées) et la survie des cellules exposées aux différentes solutions de GdNPs, et ce, quelque soit le temps d'incubation considéré ($p > 0.05$). Ce résultat indique que l'irradiation n'entraîne pas la libération de Gd libre qui pourrait induire une toxicité "chimique" sur les cellules F98.

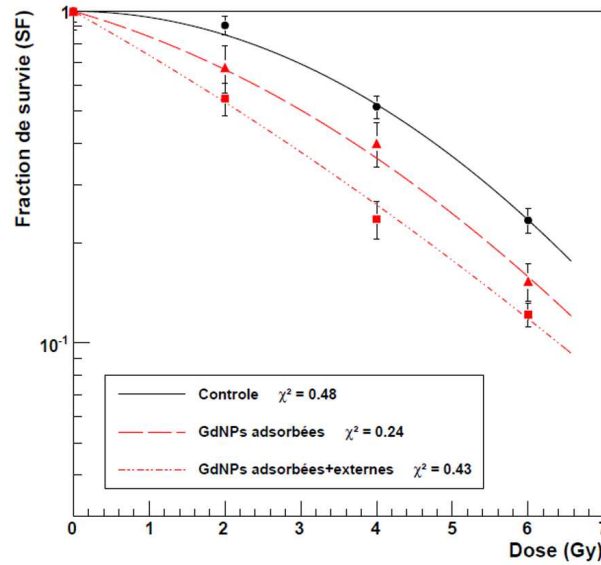
10.2.2 Dépendance de la radiotoxicité en fonction de la dose de rayons X

L'association des GdNPs et des RX a été considérée ici pour augmenter la radiotoxicité des rayonnements. Plusieurs conditions expérimentales ont été étudiées : GdNPs *externes*, *adsorbées* ou les deux à la fois (*adsorbées+externes*). Pour chaque condition expérimentale, la cytotoxicité et la distribution subcellulaire des GdNPs a été étudiée chez les cellules F98. Les résultats ont été présentés dans la partie précédente (cf. 7, p. 101). Cependant, pour faciliter la lecture, un bref résumé des conditions expérimentales est redonné dans le tableau 10.2.

La figure 10.7(a) représente les courbes de survie des cellules contrôles et irradiées en présence de GdNPs *adsorbées* ou *adsorbées+externes*.

Élément	GdNPs		
	(Externes)	(Adsorbées)	(Adsorbées+externes)
$C_{Incubation}$ (mg/mL)	-		2.1
$t_{Incubation}$ (h)	0		5
Localisation	Externes	Membrane	Membrane+Externes
$C_{Irradiation}$	2.1 mg/mL	≈ 0.6 pg/cell	≈ 0.6 pg/cell + 1.6 mg/mL

TABLE 10.2 – Conditions d’irradiation des cellules F98 en présence des GdNPs (différentes localisations subcellulaires). $[C_{Incubation}]$ indique la concentration d’incubation (mg/mL), $t_{Incubation}$ indique le temps d’incubation (h), *Localisation* précise la localisation principale des GdNPs pendant l’irradiation et $[C_{Irradiation}]$ indique la concentration de gadolinium présente au moment de l’irradiation, en fonction de sa localisation subcellulaire.



(a)

Conditions	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	$\frac{\alpha}{\beta}$ (Gy)
Contrôle	0.002 ± 0.000	0.040 ± 0.002	0.055 ± 0.004
GdNPs <i>adsorbées</i>	0.150 ± 0.021	0.026 ± 0.003	5.769 ± 1.047
GdNPs <i>adsorbées+externes</i>	0.296 ± 0.012	0.010 ± 0.001	29.600 ± 3.194

(b)

FIGURE 10.7 – (a) Survie des cellules F98 irradiées en suspension, à 51 keV, en présence de GdNPs *adsorbées* ou de GdNPs *adsorbées + externes*. La dose D correspond à une dose mesurée dans l’eau. Les paramètres des ajustements des données expérimentales par le modèle LQ ($\exp(-\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2)$) sont regroupés dans le tableau (b).

La présence des nanoparticules au moment de l'irradiation augmente la mort des cellules F98 par rapport à une irradiation seule. Le phénomène est maximal lorsque les nanoparticules sont à la fois adsorbées et externes aux cellules. L'amplitude de l'effet peut-être quantifiée grâce aux rapports α/β qui sont consignés dans le tableau 10.7(b). Ce rapport augmente en fonction de la quantité totale de nanoparticules présente au moment de l'irradiation, ce qui indique que leur présence conduit à des dommages nombreux ou complexes, qui sont difficilement réparés par les cellules. Par comparaison aux irradiations en présence de gadolinium sous forme d'AC, les NPs semblent avoir une efficacité biologique plus importante : $\alpha/\beta_{AC(2.1mg/mL)} = 4.2 \pm 1.3 \text{ Gy}$ contre $\alpha/\beta_{GdNPs(adsorbées+externes)} = 29.6 \pm 3.2 \text{ Gy}$.

10.2.3 Dépendance de la radiotoxicité en fonction de l'énergie des rayons X

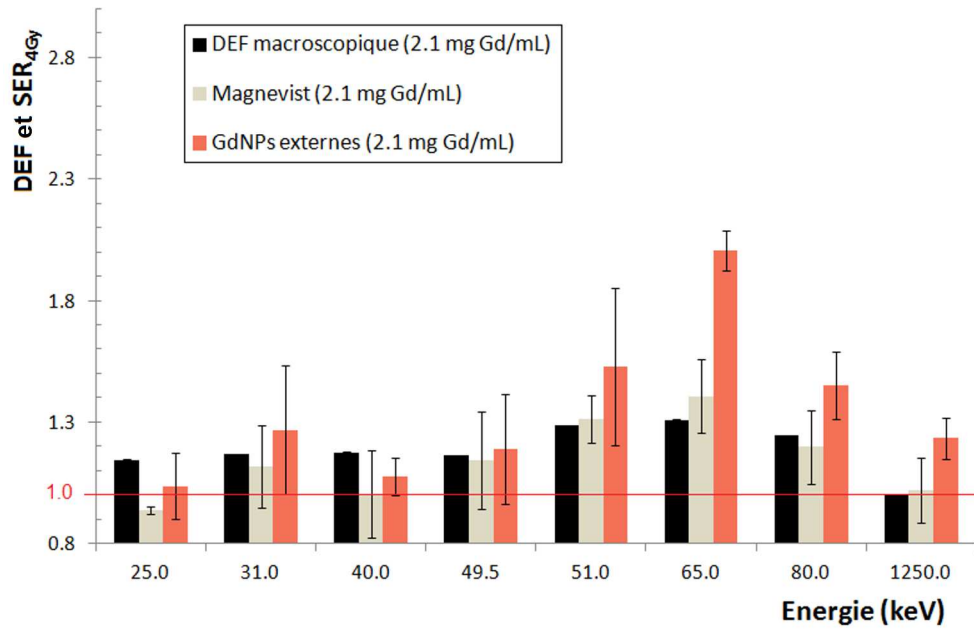
Dans le but de quantifier l'effet et de comprendre sa nature, nous avons investigué la dépendance du SER_{4Gy} à l'énergie des photons incidents. Les cellules F98 ont été irradiées (4 Gy) seules ou en présence de GdNPs (*externes*, *adsorbées* ou *adsorbées+externes*) avec différentes énergies incidentes entre 31 keV et 1.25 MeV. La figure 10.8(a) compare le SER_{4Gy} des cellules irradiées en présence des GdNPs *externes* au SER_{4Gy} obtenu avec la même concentration de gadolinium sous forme de Magnevist® et au facteur d'augmentation de dose macroscopique. La figure 10.8(b) permet quant à elle de comparer les SER_{4Gy} des conditions GdNPs *adsorbées* et *adsorbées+externes*. Le DEF macroscopique y est rappelé pour repère.

Bien que les incertitudes expérimentales soient relativement importantes, des tendances peuvent nettement être observées. Pour faciliter la lecture, les valeurs numériques des SER_{4Gy} ainsi que les p – values entre deux conditions, sont consignées dans le tableau 10.3.

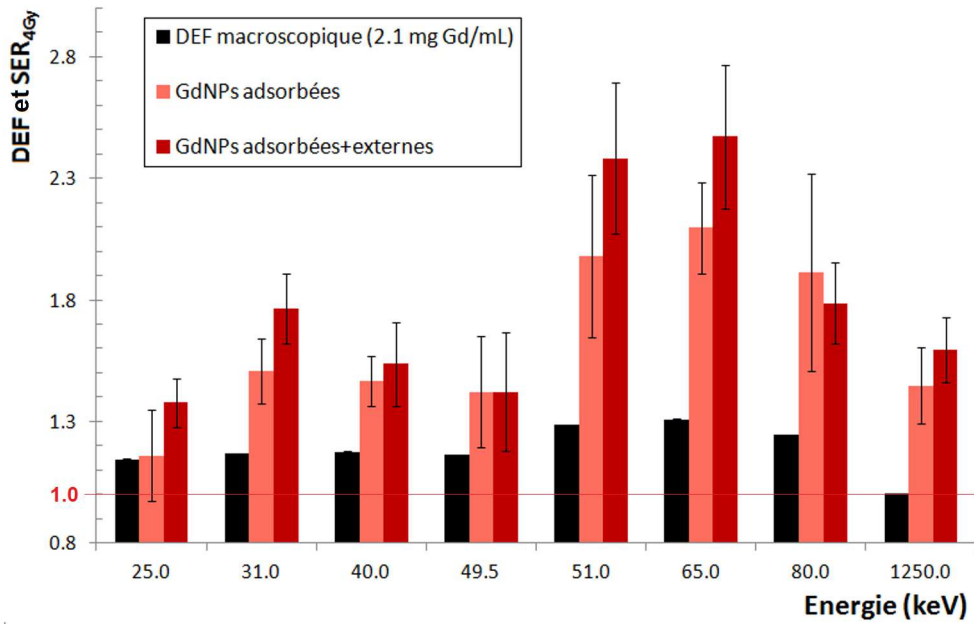
GdNPs *externes* : Les nanoparticules *externes* ont été ajoutées dans le milieu de culture juste avant l'irradiation. En supposant que leur adsorption par les cellules soit minime pendant les 15 minutes que dure l'expérience, les GdNPs sont donc distribuées de manière homogène autour des cellules pendant l'irradiation. Des expériences de spectroscopie de corrélation de fluorescence avait permis de vérifier que les GdNPs ne s'agrégeaient pas entre elles dans le milieu de culture (cf. section 7.1.4.2, p. 107).

En dessous du K-edge du gadolinium, le SER_{4Gy} est tout à fait similaire à celui du Magnevist® et au DEF calculé. Au dessus du K-edge, on observe une augmentation par rapport au gadolinium sous forme d'agent de contraste, qui est significative à 65 et 80 keV : $SER_{4Gy,GdNPs} = 2.00 \pm 0.08$ contre 1.41 ± 0.15 pour le Magnevist® à 65 keV et $SER_{4Gy,GdNPs} = 1.45 \pm 0.14$ contre 1.20 ± 0.15 pour le Magnevist® à 80 keV ($p < 0.01$ et 0.01 respectivement). A ces énergies, l'effet photoélectrique en couche K est possible et la section efficace d'interaction des photons sur les atomes de Gd est environ un ordre de grandeur plus grande qu'en dessous du K-edge. L'augmentation du SER_{4Gy} relative aux GdNPs par rapport à l'AC laisse penser que dans cette gamme énergétique (où la production de photo-électrons est maximale sur les atomes de Gd), l'assemblage des atomes de Gd en NPs favorise le dépôt de dose.

Enfin, à haute énergie (1.25 MeV), le SER_{4Gy} mesuré en présence de GdNPs est supérieur à



(a)



(b)

FIGURE 10.8 – (a) SER_{4Gy} mesurés chez des cellules F98 exposées à 2.1 mg/mL de Magnevist® (beige) ou de GdNPs *externes* (rose pâle) pendant l'irradiation, en fonction de l'énergie des photons incidents. (b) SER_{4Gy} mesurés chez des cellules F98 irradiées en présence de GdNPs *adsorbées* (rose) et de GdNPs *adsorbées+externes* (rouge foncé). Sur les deux graphes, les données expérimentales sont comparées au DEF macroscopique pour 2.1 mg Gd/mL (noir).

Énergie (keV)	DEF macroscopique (2.1 mg/mL)	$SER_{4Gy,GdAC}$ Magnevist® (2.1 mg/mL)	$SER_{4Gy,GdNPs}$		
			(Externes)	(Adsorbées)	(Adsorbées+externes)
25.0	1.15	0.94 ± 0.02 $p = 0.20$	1.04 ± 0.14	1.16 ± 0.19 $p = 0.03$	1.38 ± 0.10
31.0	1.17	1.12 ± 0.17 $p = 0.27$	1.27 ± 0.26	1.51 ± 0.13 $p = 0.01$	1.76 ± 0.14
40.0	1.18	1.00 ± 0.18 $p = 0.40$	1.08 ± 0.08	1.47 ± 0.10 $p = 0.41$	1.54 ± 0.17
49.5	1.16	1.14 ± 0.20 $p = 0.71$	1.19 ± 0.22	1.42 ± 0.23 $p = 1.00$	1.42 ± 0.24
51.0	1.28	1.31 ± 0.10 $p = 0.15$	1.53 ± 0.32	1.98 ± 0.33 $p = 0.09$	2.38 ± 0.31
65.0	1.31	1.41 ± 0.15 $p < 0.01$	2.00 ± 0.08	2.10 ± 0.19 $p = 0.06$	2.47 ± 0.30
80.0	1.24	1.20 ± 0.15 $p = 0.01$	1.45 ± 0.14	1.91 ± 0.40 $p = 0.58$	1.79 ± 0.17
1253.0	1.00	1.02 ± 0.13 $p = 0.01$	1.23 ± 0.09	1.45 ± 0.15 $p = 0.11$	1.59 ± 0.13

TABLE 10.3 – Récapitulatif des valeurs de DEF et SER_{4Gy} obtenues pour les différentes conditions expérimentales. L'erreur sur le DEF étant très faible ($< 1\%$), elle n'est pas indiquée dans le tableau. Les p – values sont indiquées pour la comparaison des conditions GdAC (Magnevist®) et GdNPs *externes*, ainsi que pour la comparaison des conditions GdNPs *adsorbées* et GdNPs *adsorbées+externes*.

1 ($SER_{4Gy,GdNPs,1.25MeV} = 1.23 \pm 0.09$), alors qu'en présence d'AC on mesurait un SER_{4Gy} de 1.02 ± 0.13 et que le DEF macroscopique est de 1.002 ± 0.002 . Ce résultat semble indiquer qu'un mécanisme différent de l'augmentation de dose physique entre en jeu. En effet à ces énergies les sections efficaces d'interactions des photons dans l'eau et le Gd sont équivalentes. Il n'y a donc pas de différentiel possible à ce niveau. Deux hypothèses peuvent donc être proposées pour expliquer cette différence à 1.25 MeV :

- Les particules secondaires créées dans le milieu d'irradiation (majoritairement) interagissent à leur tour avec les GdNPs entraînant une cascade électronique qui favorise la dose par rapport à la distribution de gadolinium sous forme moléculaire. Cette hypothèse semble cependant critiquable puisque si elle se vérifiait, un différentiel entre Magnevist® et GdNPs devrait également être observé en dessous du K-edge ($E < 50.25$ keV). Par ailleurs, les simulations produites par Rachel Delorme ne valident pas cette hypothèse.
- A cette énergie, les cellules restent environ deux fois plus longtemps au contact des GdNPs que lorsque les irradiations sont réalisées au synchrotron. En effet, la source de cobalt est plus éloignée du laboratoire ce qui entraîne un temps expérimental d'environ 25 à 30 minutes (au lieu de 15 min pour les énergies dans la gamme du keV). Pendant ce temps, il est probable que les GdNPs commencent à être adsorbées par les cellules F98 et que cette distribution non uniforme soit responsable de l'augmentation de la radiosensibilité des cellules irradiées en présence de GdNPs *externes*.

GdNPs adsorbées : L'incubation des cellules F98 en présence de GdNPs pendant 5h avant l'irradiation entraîne une forte augmentation du SER_{4Gy} par rapport à l'AC et ce quelque soit l'énergie des photons incidents (cf. Fig. 10.8(b)). La différence est significative pour toutes les énergies ($p < 0.05$) et la dépendance énergétique donne plusieurs informations. Bien que l'amplitude soit plus grande, la forme du SER_{4Gy} reste similaire à celle du DEF : On observe expérimentalement le saut du K-edge ($SER_{4Gy, GdNPs-adsorbées, 49.5keV} = 1.42 \pm 0.23$ et $SER_{4Gy, GdNPs-adsorbées, 51keV} = 1.98 \pm 0.33$, $p = 0.02$) et un maximum d'effet à 65 keV ($SER_{4Gy, GdNPs-adsorbées, 65keV} = 2.10 \pm 0.19$). Cette dépendance énergétique indique que la radiotoxicité est en partie au moins, due à la photoactivation du gadolinium.

A haute énergie, le SER_{4Gy} est nettement supérieur à 1 ($SER_{4Gy, GdNPs-adsorbées, 1.25MeV} = 1.45 \pm 0.15$), indiquant cette fois-ci qu'une partie de la radiotoxicité mesurée est attribuée à un mécanisme de radiosensibilisation différent de la photoactivation des atomes lourds. Dans la partie précédente, nous avons mesuré les conséquences de l'incubation des cellules F98 avec les GdNPs. Bien que 5h en présence de 2.1 mg Gd/mL n'entraîne pas de diminution significative de la survie, les cellules observaient un arrêt de la prolifération (réversible au bout d'environ 3 jours après incubation) et une perturbation de leur cycle cellulaire avec principalement une accumulation des cellules en G2/M que l'on pouvait mesurer 24h après la fin de l'accumulation. Il est raisonnable de penser que l'effet délétère des rayonnements soit moins bien géré par les cellules stressées que par les cellules contrôles.

GdNPs adsorbées + externes : L'addition des GdNPs adsorbées par les cellules aux GdNPs externes pendant l'irradiation conduit à une petite augmentation du SER_{4Gy} par rapport aux GdNPs adsorbées seules (cf. Fig. 10.8(b)). Les effets semblent en partie s'ajouter mais les différences ne sont pas significatives et l'adsorption des GdNPs par les cellules F98 est la condition qui maximise la toxicité du rayonnement.

L'ensemble de ces résultats montre que les GdNPs ont un pouvoir radiosensibilisant bien plus important qu'une même quantité de gadolinium sous forme d'AC. Dans le cas de l'AC, l'augmentation de la mort cellulaire est directement liée à l'augmentation de dose (DEF) (cf. Fig. 10.5) et aucun bénéfice n'est mesuré à haute énergie. Dans le cas des GdNPs, la photoactivation des atomes lourds s'associe à un mécanisme de radiosensibilisation différent pour augmenter la radiotoxicité des rayonnements (jusqu'à un maximum de 2.47 ± 0.30 lorsque les GdNPs sont adsorbées+externes et pour un faisceau de photons de 65 keV). La perturbation du cycle cellulaire et l'arrêt de la prolifération mesurés après l'incubation des cellules en présence des GdNPs sont des arguments pour appuyer l'hypothèse d'une moins bonne réparation des dommages radio-induits chez les cellules irradiées en présence de GdNPs adsorbées. Des expériences complémentaires de mesures des dommages de l'ADN par exemple, seraient intéressantes pour vérifier cette hypothèse.

10.3 Radiosensibilisation des cellules F98 par les NPs d'or et de platine

Les nanoparticules d'or et de platine, obtenues dans le cadre d'une collaboration avec Boris Kysela (Université de Birmingham) et décrites précédemment (cf. section 5.3, p. 85), ont également été associées à un rayonnement de photons afin de mesurer leur potentiel pour la radiosensibilisation

tumorale. Le modèle est différent des GdNPs puisque nous avons vu dans la partie précédente que les NPs étaient cette fois-ci majoritairement internalisées dans le cytoplasme des cellules F98 après incubation (cf. section 7.2.4, p. 113). Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la radiotoxicité de la combinaison RX/NPs , en fonction de l'élément lourd Or ou Platine et en fonction de l'énergie des photons incidents. Cette fois-ci, une seule condition expérimentale a été considérée : avant l'irradiation, les cellules F98 ont été incubées pendant 24h à 37°C avec les NPs selon le protocole décrit au paragraphe 6.2.2, p. 93. Elles ont ensuite été rincées et irradiées en suspension dans du milieu de culture vierge (sans NPs). Le tableau 10.4 rappelle les concentrations moyennes internalisées pour chaque type de NPs. La survie cellulaire et le SER_{4Gy} ont ensuite été calculés à partir des résultats des tests clonogéniques, de la même manière que pour les GdNPs.

Élément	AuNPs		PtNPs	
	peptide 1	peptide 3	peptide 1	peptide 3
$C_{Incubation}$ (mg/mL)	0.46		0.04	
(NPs/mL)	$1.6 \cdot 10^{12}$		$1.6 \cdot 10^{12}$	
$t_{Incubation}$ (h)	24		24	
Localisation	Cytoplasme		Cytoplasme	
$C_{Irradiation}$	≈ 0.6 pg/cell	≈ 0.7 pg/cell	$\approx 9.0 \cdot 10^{-3}$ pg/cell	$\approx 1.5 \cdot 10^{-2}$ pg/cell

TABLE 10.4 – Conditions d'irradiation des cellules F98 en présence de NPs d'or et de platine. $[C_{Incubation}]$ indique la concentration d'incubation (mg/mL ou NPs/mL), $t_{Incubation}$ indique le temps d'incubation (h), *Localisation* précise la localisation principale des éléments pendant l'irradiation et $[C_{Irradiation}]$ indique la concentration de NPs internalisées, au moment de l'irradiation.

10.3.1 Réponse cellulaire

La survie cellulaire a été déterminée par test clonogénique sur des cellules F98 incubées pendant 24h en présence de Au ou PtNPs, fonctionnalisées par les différents peptides 1 ou 3 et irradiées à 0, 2, 4 et 6 Gy par des faisceaux de photons monochromatiques. Trois énergies d'irradiation ont été utilisées : énergies inférieure ou supérieure de 300 eV au K-edge de l'élément, ou haute énergie (1.25 MeV, source de cobalt 60). A cause d'une mauvaise estimation du nombre de cellules à ensemercer pour les irradiations à 6 Gy, il a été impossible d'évaluer le nombre de colonies pour cette dose et nous ne présenterons les courbes de survie, que dans une plage de doses restreinte (0 - 4 Gy). L'ajustement des données expérimentales par la fonction LQ étant moins fiable à partir de ces petits jeux de données, nous ne chercherons pas ici à discuter de manière quantitative les paramètres α et β . Le SER_{4Gy} a été utilisé pour quantifier l'amplitude de la radiotoxicité. La normalisation des courbes de survie étant différente de celle nécessaire au calcul du SER_{4Gy} , les tendances sont parfois inversées entre les courbes et les mesures de SER_{4Gy} . Ces écarts sont cependant largement compris dans les erreurs expérimentales. Les différents résultats relatifs aux AuNPs et PtNPs sont présentés sur les figures 10.9 et 10.10 respectivement.

Les AuNPs augmentent la radiotoxicité de l'irradiation lorsque le rayonnement est de basse énergie (80.4 ou 81.0 keV) (cf. Fig. 10.9). Les SER_{4Gy} mesurés en dessous du K-edge de l'or valent

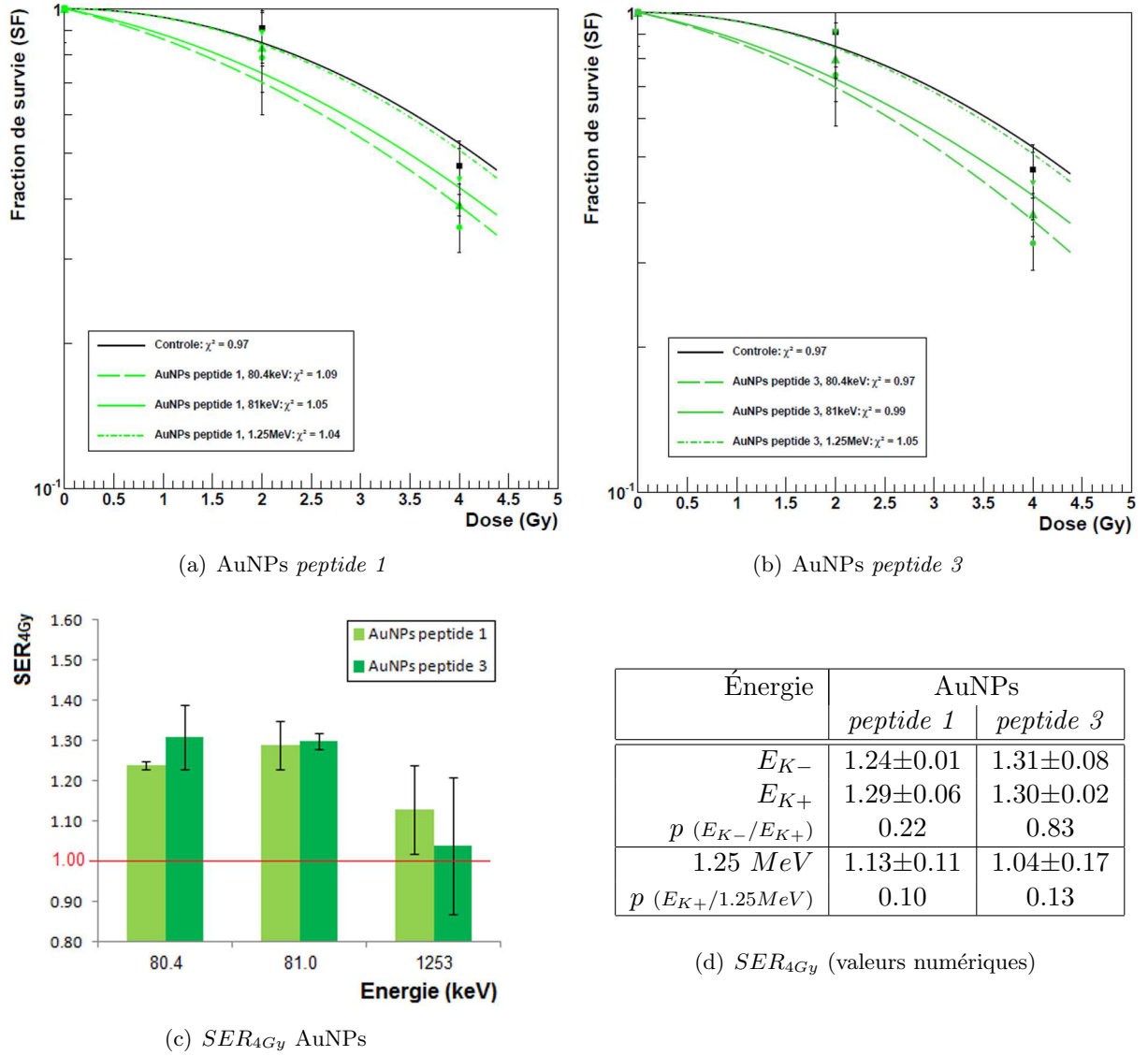


FIGURE 10.9 – Survie des cellules F98 incubées pendant 24h en présence de AuNPs (a) *peptide 1* et (b) *peptide 3*, puis irradiées en suspension dans du milieu de culture vierge. Le SER_{4Gy} est représenté sur l'histogramme (c) en fonction de l'énergie des photons incidents, et les valeurs numériques sont précisées dans le tableau (d).

1.24 ± 0.01 et 1.31 ± 0.08 , pour les *peptides 1* et *3* respectivement. Les valeurs ne sont pas significativement différentes lorsque l'irradiation est réalisée au dessus du K-edge : $SER_{4Gy, E_{K+}} = 1.29 \pm 0.06$ et 1.30 ± 0.02 , pour les *peptides 1* et *3* respectivement ($p = 0.22$ et 0.83). Les deux peptides conduisent à des effets tout à fait comparables pour une énergie donnée ($p > 0.05$ quelque soit l'énergie d'irradiation).

Lorsque l'irradiation est réalisée avec la source de Cobalt 60 (1.25 MeV), la survie cellulaire est proche de celle des cellules contrôles et l'on mesure un SER_{4Gy} de 1.13 ± 0.11 et 1.04 ± 0.17 , pour les *peptides 1* et *3* respectivement. Bien que ces valeurs ne soient pas significativement différentes des

SER_{4Gy} mesurés à basse énergie, les AuNPs semblent induire un effet radiotoxique qui s'appuie principalement sur la photoactivation des atomes d'or.

De la même manière que pour les AuNPs, les PtNPs augmentent la radiotoxicité de l'irradiation (cf. Fig. 10.10(a) et 10.10(b)), mais avec une dépendance en fonction de l'énergie incidente différente. Pour un peptide donné, les valeurs de SER_{4Gy} ne sont pas significativement différentes entre les trois énergies de photons (les valeurs de SER_{4Gy} et les p – values sont consignées dans le tableau 10.10(d)). Bien que l'augmentation de la radiotoxicité à haute énergie soit légèrement plus faible qu'à basse énergie, elle n'est pas nulle : $SER_{4Gy,1.25MeV} = 1.26 \pm 0.05$ et 1.18 ± 0.09 , pour le *peptide 1* et le *peptide 3* respectivement. Cette mesure indique que les NPs de platine augmentent la radiotoxicité à la fois par la photoactivation des atomes de platine mais aussi (et a priori, majoritairement) par un autre mécanisme de radiosensibilisation différent. De manière surprenante, les mesures du cycle cellulaire après incubation en présence des différentes NPs avaient montré que les PtNPs étaient celles qui perturbaient le moins le cycle (cf. section 7.2.3, p. 111). Mais, on avait également observé que les nanoparticules de platine étaient celles qui diminuaient le plus la survie des cellules F98 non irradiées, simplement exposées pendant 24h aux NPs. Bien que cette diminution n'a pas entraîné de différence significative par rapport à la survie des cellules contrôles, elle a pu être observée sur le graphe 7.7. Cette très faible cytotoxicité est susceptible d'être amplifiée en combinaison d'une irradiation de photons et ce phénomène pourrait expliquer la radiotoxicité mesurée ici.

Par ailleurs, les PtNPs, qui sont internalisées à une concentration plus faible que les AuNPs (environ un ordre de grandeur en moins) conduisent à une radiotoxicité comparable et proche de 1.3 pour les conditions expérimentales testées. Une étude faisant varier la concentration des NPs serait intéressante afin de comprendre plus précisément les mécanismes de radiosensibilisation mis en jeu par ces différentes NPs.

A l'inverse, les AuNPs qui sont internalisées par les cellules F98 à une concentration proche des GdNPs *adsorbées* (de l'ordre de 0.6 pg/cell), conduisent à un SER_{4Gy} significativement plus faible (les irradiations utilisant une énergie supérieure au K-edge respectif de chaque élément sont comparées entre elles). Le SER_{4Gy} relatif aux GdNPs *adsorbées* irradiées à 51 keV (1.98 ± 0.33) peut être comparé aux SER_{4Gy} relatifs aux AuNPs irradiées à 81 keV (1.29 ± 0.06 pour le *peptide 1* et 1.30 ± 0.02 pour le *peptide 3*). Les différences par rapport aux GdNPs sont significatives pour les deux types de AuNPs ($p = 0.01$ et 0.03 respectivement).

L'ensemble des résultats obtenus à partir des trois types de NPs utilisées (Gd, Au et PtNPs) sur les cellules F98 confirme la complexité de l'interaction NPs/cellules et la variété des réponses qu'elles peuvent engendrer en combinaison à une irradiation de photons. Dans tous les cas, les NPs augmentent la radiotoxicité d'une irradiation de photons (avec un effet préférentiel aux basses énergies) et la localisation subcellulaire des NPs ainsi que la cytotoxicité propre à chaque type de NPs sont deux paramètres qui peuvent influencer l'importance de l'effet. Cela montre que chaque type de NPs peut avoir des conséquences très spécifiques sur une population de cellules et que ces spécificités doivent être prises en compte pour les applications *in vivo*.

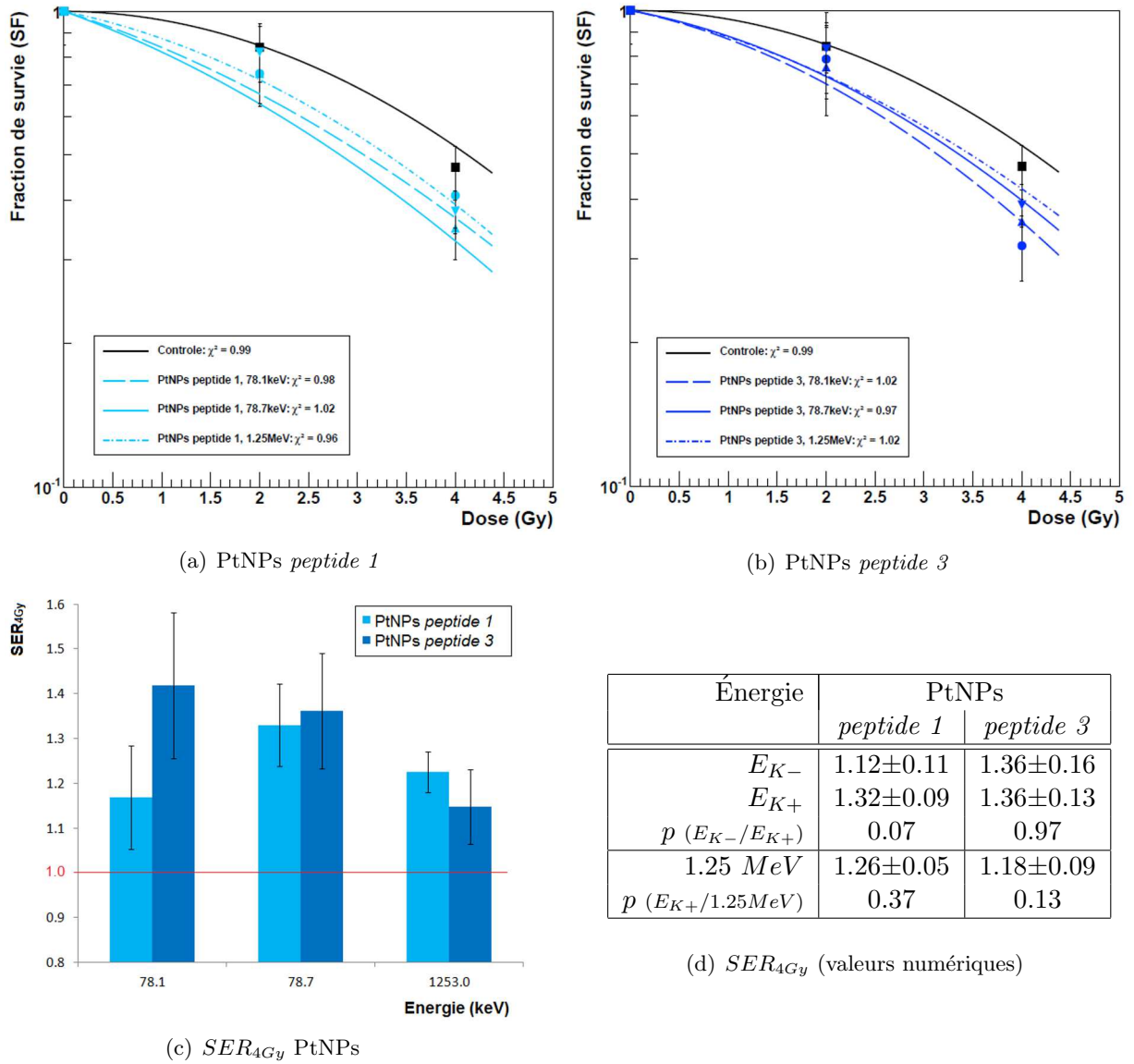


FIGURE 10.10 – Survie des cellules F98 incubées pendant 24h en présence de PtNPs (a) *peptide 1* et (b) *peptide 3*, puis irradiées en suspension dans du milieu de culture vierge. Le SER_{4Gy} est représenté sur l'histogramme (c) en fonction de l'énergie des photons incidents, et les valeurs numériques sont précisées dans le tableau (d).

10.3.2 Réponse tumorale

Les NPs d'or (*peptide 1* et *peptide 3*) ont fait l'objet d'essais pré-cliniques chez le rat porteur d'un gliome F98 (cf. 5.1.2, p.82). Les animaux ont reçu une injection intracérébrale de NPs à J13 ($1.52 \mu g/mL$, $10 \mu L$, $0.5 \mu L/min$), puis une radiothérapie (fraction unique $15 Gy$, $81 keV$, 5 incidences) à J14. Les détails expérimentaux ont été décrits au paragraphe 9.3.2, p. 148. L'étude préliminaire de toxicité a permis de vérifier qu'une telle injection de NPs n'induisait pas de toxicité particulière chez l'animal sain, quelque soit le type de NPs (*peptide 1* ou *peptide 3*) (cf. 7.3, p.117).

Les résultats de survie sont présentés dans la figure 10.11 et résumés dans le tableau 10.5.

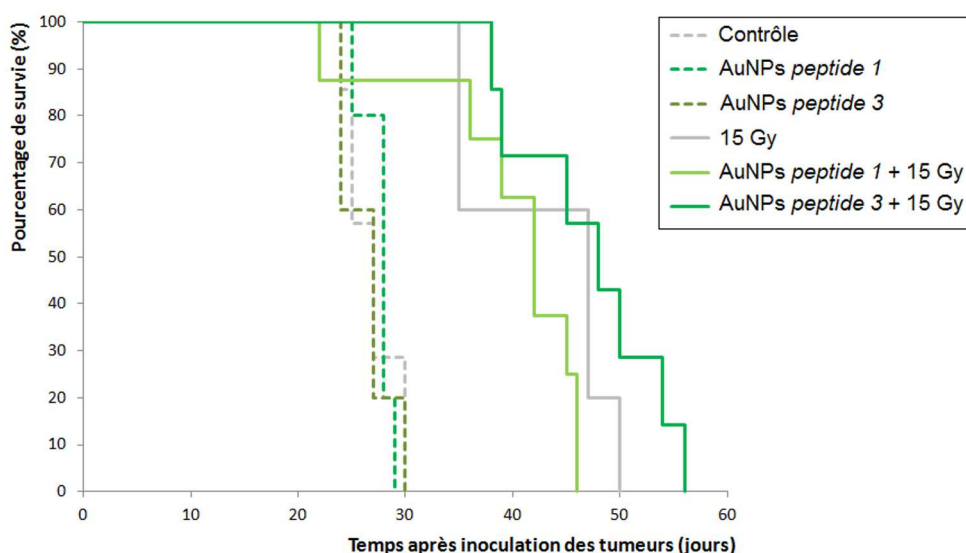


FIGURE 10.11 – Courbe de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par une injection intracérébrale de NPs d'or (*peptide 1* ou *peptide 3*), combinée ou non à une irradiation X. La chimiothérapie est administrée à J13 par CED ($1.5 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}$, $10 \mu\text{L}$, $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$). La radiothérapie est délivrée en une fraction unique de 15 Gy ($E_{ph.}=81.0 \text{ keV}$) distribuée selon 5 incidences.

Groupe	Survie			%ILS	
	intervalle	moy. \pm SD	médiane	moyenne	médiane
Contrôle (ϕ)	24-30	27 ± 1	27	-	-
AuNPs <i>peptide 1</i>	25-29	28 ± 1	28	2.6%	-
AuNPs <i>peptide 3</i>	24-30	26 ± 1	27	-2.6%	-
15 Gy	35-50	43 ± 3	47	59.1%	74.0%
AuNPs <i>peptide 1</i> + 15 Gy	22-46	40 ± 3	42	48.0%	55.6%
AuNPs <i>peptide 3</i> + 15 Gy	38-56	47 ± 3	48	75.0%	77.8%

TABLE 10.5 – Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats porteurs de gliome F98 et traités par une injection intracérébrale de NPs d'or (*peptide 1* ou *peptide 3*), combinée ou non à une irradiation X (15 Gy , 81 keV).

De la même façon que l'injection intracérébrale des AuNPs n'entraîne pas de toxicité chez les animaux sains, aucune toxicité propre aux AuNPs (*peptide 1* et *peptide 3*) n'est observée chez les animaux porteurs de tumeur cérébrale. Une analyse histologique des cerveaux permettrait de compléter ces résultats et de vérifier les conséquences tissulaires des injections. Les survies des animaux non irradiés sont très peu étalées et valent en moyenne $27 \pm 1 \text{ j}$, $28 \pm 1 \text{ j}$ et $26 \pm 1 \text{ j}$ pour les animaux témoins (ϕ), ayant reçu une injection de AuNPs *peptide 1* et une injection de AuNPs

peptide 3 respectivement. Aucune différence significative de survie n'a été mesurée entre ces groupes ($p > 0.5$ selon le test du Log-Rank).

La radiothérapie améliore de façon significative la survie des animaux conduisant à un pourcentage d'augmentation de survie de 59.1% pour les animaux traités par radiothérapie seulement ($p = 0.001$ entre les conditions contrôle et radiothérapie seule). Les résultats relatifs au traitement combiné (AuNPs/*RX*) sont plus mitigés. Les AuNPs fonctionnalisées par le *peptide 1* semblent induire une légère radiotoxicité qui pourrait expliquer les décès précoces de ce groupe. A l'inverse, les animaux traités par les AuNPs *peptide 3* présentent un plus grand pourcentage d'augmentation de survie que les animaux ayant reçu la radiothérapie uniquement : %*ILS* = 75.0% contre 59.1% seulement pour la radiothérapie seule. Cependant, aucune différence n'est significative entre les survies des groupes ayant reçu le traitement combiné ou la radiothérapie seule ($p = 0.11$ et 0.25 pour les *peptides 1* et *3* respectivement).

10.4 Conclusion

L'ensemble des résultats présentés ici indique un net pouvoir radiosensibilisant des NPs *in vitro*. La comparaison des survies des cellules F98 irradiées en présence de GdNPs ou Gd sous la forme d'AC (GdAC) montre un réel avantage des nanoparticules (à concentrations en atomes lourds comparables). Cette meilleure efficacité biologique a été mesurée au travers des coefficients α/β qui vaut 0.05 ± 0.01 Gy pour les cellules contrôles (irradiation seule) et jusqu'à 29.6 ± 3.2 Gy pour les cellules irradiées à 51 keV en présence de GdNPs. Cette différence indique une augmentation importante du nombre de dommages radio-induits chez les cellules traitées par la combinaison *RX*/NPs.

L'étude de la dépendance énergétique de l'effet a permis de mettre en évidence différents paramètres. Tout d'abord, il est intéressant de voir que la survie des cellules irradiées en présence d'un AC (externe aux cellules) est directement reliée à l'augmentation de dose macroscopique (cf. Fig. 10.5). Plus la quantité d'atomes lourds est importante dans le milieu, plus la dose et le taux de radicaux libres créés augmentent. Bien que notre protocole de mesures des radicaux libres OH• ne permettent pas de mettre en évidence la même relation de linéarité entre ces deux quantités, que celle observée pour le DEF entre 0 et 10 mg/mL de gadolinium, ces deux facteurs expliquent entièrement l'augmentation de la mort cellulaire mesurée en présence de gadolinium sous forme d'AC. Ce résultat est conforté par les irradiations réalisées à haute énergie (1.25 MeV), où aucune différence n'a été observée par rapport aux irradiations contrôles.

Lorsque le gadolinium est introduit sous forme de NPs, la dépendance énergétique conserve une forme similaire (maximum d'effet à 65 keV et minimum d'effet à haute énergie), mais présente une amplitude plus grande (cf. Fig. 10.8(b)). A concentration de gadolinium identique, les GdNPs adsorbées + externes ont conduit à un $SE_{R_{4Gy}}$ 1.8 fois plus grand de le Magnevist® : 2.47 ± 0.30 versus 1.41 ± 0.15 . L'adsorption des NPs par les cellules avant l'irradiation s'est montrée être une condition importante pour maximiser la radiotoxicité. Le $SE_{R_{4Gy}}$ supérieur à 1 obtenu à haute énergie pour les GdNPs adsorbées (1.45 ± 0.15) ne s'explique ni par les calculs de DEF macroscopique (cf. Fig. 8.2), ni par les calculs de DEF local (dans une sphère de 500 nm autour de la NP) réalisés par R. Delorme (cf. Fig. 8.8). Ce résultat semble indiquer la présence d'un mécanisme

de radiosensibilisation différent de la photoactivation des atomes lourds, associé aux GdNPs. Ce mécanisme a pour l'instant été mis en relation avec la perturbation du cycle cellulaire et l'arrêt de la prolifération observés chez les cellules F98 après incubation en présence des GdNPs.

Les calculs du DEF local ont permis de mettre en évidence la forte augmentation de dose au niveau des membranes des cellules lorsque celles-ci sont irradiées à basse énergie en présence de NPs (100 nm) distribuées autour des cellules. Les GdNPs étant majoritairement adsorbées sur les membranes des cellules F98 après incubation, il est très probable que l'augmentation de dose locale qu'elles produisent ait des conséquences sur l'intégrité des membranes cellulaires. Les dommages radio-induits des membranes sont de manière générale, moins étudiés que ceux de l'ADN, mais l'importance des SER_{4Gy} mesurés pour une irradiation en présence de GdNPs *adsorbées* pourrait indiquer l'importance de l'intégrité des membranes pour la survie des cellules.

Les études réalisées avec les nanoparticules d'or et de platine ont quant à elles, montré que ces phénomènes dépendaient fortement du type de NPs. Sur la même lignée cellulaire, les AuNPs conduisent à l'augmentation de la mort cellulaire pour des irradiations à basse énergie principalement. L'augmentation de la radiotoxicité semble donc provenir essentiellement de la photoactivation des atomes d'or. L'amplitude du phénomène est par contre beaucoup plus faible que celle induite par les GdNPs et ces petites variations entre les différentes énergies d'irradiation n'ont pas conduit à des différences significatives de survies cellulaires en dessous et au dessus du K-edge de l'or. La clonogénicité semble présenter une limite et ne s'avère peut être pas être le meilleur moyen pour mettre en évidence les conséquences biologiques de petites variations d'effets physiques. Les PtNPs (internalisées à une concentration de l'ordre de 10 fois plus faible que les AuNPs par les cellules F98) conduisent quant à elles à une augmentation de la mort cellulaire comparable aux AuNPs (de l'ordre de 30% de plus par rapport aux cellules contrôles), mais avec une amplitude qui dépend peu de l'énergie des photons incidents. Cette différence majeure semble indiquer que la radiotoxicité vient cette fois ci principalement d'un mécanisme biologique indépendant de la photoactivation des atomes de platine. Des expériences complémentaires sur ce point permettraient d'identifier la nature de l'effet observé ici. Par ailleurs, du fait de la plus faible quantité de NPs (Au et Pt) disponible pour ces expériences, nous n'avons pas pu répéter un grand nombre de fois ces irradiations (l'expérience a été réalisée en triplicatas seulement), et la répétition des mesures semble nécessaire pour quantifier plus précisément l'augmentation de la radiotoxicité.

Enfin, l'essai pré-clinique qui a été réalisé sur des rats porteurs de gliome F98 n'a pas permis de conclure à une efficacité significative des AuNPs *in vivo*. Cependant, les animaux ont bien toléré les injections intracérébrales de NPs et l'importance des SER_{4Gy} mesurés *in vitro* pousse à chercher un moyen d'optimiser le traitement des animaux. Le recouvrement de la tumeur par les NPs est un point clé de la réussite du traitement. En effet, 10 cellules F98 laissées dans le cerveau suffisent à entraîner la mort de l'animal. Il est donc important de toucher la totalité des cellules tumorales. Les injections directes de drogues permettent d'en augmenter la concentration localement. Malheureusement cet avantage est limité par le fait que la distribution de la drogue ne représente pas aussi bien le volume tumoral que lorsqu'on réalise une injection par voie veineuse. Les paramètres d'injection directe (volume, débit, point d'injection) doivent donc être optimisés afin de maximiser le recouvrement de la tumeur par les NPs. Cette contrainte nous a amenés à mettre en place un protocole d'imagerie à deux énergies permettant d'imager simultanément la tumeur et la distribution des NPs dans le cerveau. Cette étude est présentée dans la partie qui suit.

Quatrième partie

Imagerie des nanoparticules injectées localement dans un gliome

Chapitre 11

Tomographie X à deux énergies : principe et intérêts

Sommaire

11.1 La tomographie à deux énergies	177
11.1.1 Origine de la méthode	177
11.1.2 Application pour la décomposition d'un mélange d'éléments	179
11.2 Vers une application médicale	182
11.3 Conclusion et problématique	184

La dernière partie de ce travail est consacrée à l'étude de la distribution des NPs dans le cerveau d'un rongeur porteur d'un gliome, à la suite d'une injection directe. Le recouvrement de la tumeur par les NPs est un point essentiel pour le succès d'une radiothérapie renforcée par éléments lourds. Si la distribution des NPs n'est pas optimale (tant en concentration qu'en volume), la radiothérapie n'a que peu de chances d'être bénéfique.

La tomographie à deux énergies est une méthode d'imagerie qui permet de cartographier trois éléments mélangés à l'intérieur d'un même objet. Elle a d'abord été proposée pour une application dans le domaine de la pétrochimie mais son intérêt pour l'imagerie médicale est vite apparu. Un set-up expérimental dédié a été implémenté sur ID17 au début de ce projet pour imager de manière simultanée et quantitative deux éléments lourds *in vivo*.

Dans ce chapitre, nous expliquons le principe général de la méthode et détaillons les différents résultats obtenus jusqu'à maintenant. Les prochains chapitres seront ensuite dédiés à la présentation de la méthode implémentée sur ID17, sa caractérisation et son application pour l'imagerie simultanée de la tumeur (contrastée par la présence d'un AC iodé) et des nanoparticules de gadolinium (GdNPs, injectées par voie directe) pour renforcer localement la dose.

Introduction

Nous l'avons vu dans la partie précédente, l'efficacité de la SSRT est étroitement liée à la distribution des atomes lourds (qu'ils soient sous forme d'agents de contraste, de molécules chimiothérapeutiques ou de nanoparticules) dans la tumeur. Cependant, cette distribution est difficilement optimisable, et d'autant plus lorsqu'on cherche à cibler une tumeur cérébrale. Une solution injectée par voie veineuse s'accumule là où la BHE est lésée. Comme elle est partiellement rompue au niveau de la tumeur, la solution diffuse spécifiquement dans cette région, permettant un ciblage passif assez représentatif de la masse tumorale. Cependant, ce ciblage n'est pas complet (puisque la BHE n'est pas rompue partout dans la tumeur) et il est limité par la concentration en atomes lourds que l'on peut accumuler par cette voie d'injection. Une injection veineuse de 1.5 mL d'Ioméron® (concentration en iode : 350 mg/mL) s'accumule à hauteur d'environ 1-2 mg/mL dans un gliome chez le rat, conduisant à un facteur de dilution de l'ordre de 100. Dans le cas des NPs, qui sont pour le moment onéreuses et produites dans des proportions beaucoup plus faibles, il est difficile d'envisager une accumulation suffisante dans la tumeur cérébrale pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie par cette voie d'injection. D'autre part, une injection intraveineuse (*i.v.*) nécessite l'emploi d'une solution stable dans la circulation sanguine. Les agents de contraste le sont, mais d'autres composés comme l'IUdR par exemple, ne le sont pas. Enfin, les solutions injectées doivent également être bien tolérées *in vivo* et les problèmes de toxicité peuvent limiter leur utilisation en *i.v.* Pour contrer ces limites, la méthode d'injection mise en place pour les études pré-cliniques dans l'équipe est la CED (convection-enhanced delivery) décrite à la section 1.2.6, p. 13. Cette méthode d'injection locale au débit d'injection lent et contrôlé, permet de maximiser le volume de distribution de la solution dans la tumeur et de limiter les gradients de concentrations trop importants. Néanmoins, la distribution de la solution injectée localement dépend fortement des paramètres d'injection (volume, débit, site d'injection) et de l'environnement traité (pression intratumorale, *etc.*). Pour prévoir la dosimétrie d'un traitement de radiothérapie synchrotron combiné à une injection locale de NPs, il est indispensable de connaître de manière quantitative leur distribution spatiale et ce, relativement au volume tumoral. Pour y parvenir, nous avons idéalement besoin d'imager simultanément la tumeur et la distribution des atomes lourds par rapport à celle-ci.

Cette troisième et dernière partie présente une méthode de tomographie à deux énergies mise en place sur la ligne de lumière ID17 de l'ESRF. Elle permet d'extraire la distribution 3D et les concentrations de deux agents de contraste injectés simultanément *in vivo*. Dans notre étude, ces deux agents seront l'Ioméron® (injecté en *i.v.*, il permet de mettre en évidence la région où la BHE est lésée) et les GdNPs (injectées par CED). Ce premier chapitre sera consacré à la description de la technique de tomographie à deux-énergie : son principe, ses applications les plus courantes et leurs limites. Nous détaillerons ensuite les méthodes expérimentales mises en place pour cette étude. Finalement, un dernier chapitre présentera les principaux résultats : depuis la caractérisation de la méthode, jusqu'aux applications *in vivo* pour l'étude de la distribution des GdNPs injectées localement dans une tumeur cérébrale implantée chez le rat. Deux principales questions ont été posées dans le cadre des études *in vivo* : Comment les GdNPs injectées par CED se distribuent-elles par rapport au volume tumoral et comment s'éliminent-elles dans le temps ? Dans quelles mesures la distribution de l'iode injecté par voie veineuse représente la tumeur ?

11.1 La tomographie à deux énergies

Comme le montre la figure 11.1, les propriétés d'atténuation des photons dans la matière dépendent de leur énergie et de la matière traversée. On peut donc imaginer retrouver les propriétés des matériaux en utilisant des rayons X à différentes énergies pour les imager. La tomographie à deux énergies applique ce principe. Elle se base sur l'acquisition tomographique d'un même objet avec deux faisceaux d'énergies différentes. Elle a initialement été proposée par *Alvarez et al.* en 1976 qui souhaitaient améliorer les techniques de CT (*Computed Tomography*) conventionnelles en imageant les densités électroniques (ρ_e) et les numéros atomiques effectifs (Z_{eff}) des matériaux, en plus des coefficients d'atténuation linéiques (μ) classiquement imagés en CT. Pour les auteurs, la CT conventionnelle est limitée par l'approximation qui est faite lorsqu'on considère une énergie moyenne (\bar{E}) pour reconstruire les coefficients d'atténuation $\mu(E)$. La détection des modifications du spectre énergétique total après avoir interagi dans un objet doit permettre d'extraire des informations plus précises sur l'objet. Par exemple, là où le coefficient d'atténuation linéique ne permet pas de faire de distinction entre une augmentation de densité et un changement de structures, ces informations complémentaires le permettraient [Alva 76]. La technique laisse entrevoir d'importantes perspectives pour le diagnostic médical et notamment pour la mammographie, où les micro-calcifications recherchées sont difficilement distinguables des tissus normaux.

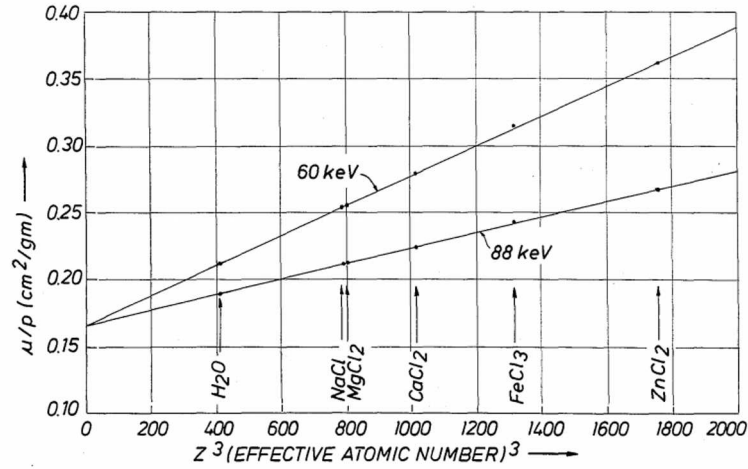


FIGURE 11.1 – Dépendance du coefficient d'atténuation massique (μ/ρ) au numéro atomique effectif du matériau traversé et de l'énergie des RX (deux énergies considérées : 60 et 88 keV). Figure extraite de [Vine 86].

11.1.1 Origine de la méthode

Dans le domaine énergétique de l'imagerie médicale ($E < 140 \text{ keV}$) le coefficient d'atténuation linéique d'un matériau peut s'exprimer par la fonction :

$$\mu(E) = a_1 \frac{1}{E^3} + a_2 f_{KN}(E) \quad (11.1)$$

où $f_{KN}(E)$ est la fonction de Klein-Nishina :

$$f_{KN}(\alpha) = \frac{1+\alpha}{\alpha^2} \left[\frac{2(1+\alpha)}{1+2\alpha} - \frac{1}{\alpha} \ln(1+2\alpha) \right] + \frac{1}{2\alpha} \ln(1+2\alpha) - \frac{(1+3\alpha)}{(1+2\alpha)^2} \quad (11.2)$$

et $\alpha = E/510.975 \text{ keV}$.

Le premier terme de l'équation (11.1) approxime la contribution de l'effet photoélectrique qui dépend fortement du numéro atomique Z du matériau. A l'opposé, la fonction $f_{KN}(E)$ représente la contribution de la diffusion Compton, qui dépend fortement de la densité électronique (proportionnelle à la densité de masse pour beaucoup de composés). Cette expression ne tient pas compte des autres processus d'interactions qui sont négligeables dans le domaine énergétique de l'imagerie médicale. Les coefficients a_1 et a_2 , donnés par les équations (11.3) et (11.4), sont directement reliés aux paramètres ρ , A et Z , qui désignent la masse volumique, le nombre de masse et le numéro atomique du matériau respectivement.

$$a_1 \approx K_1 \frac{\rho}{A} Z^n, \quad n \approx 4 \quad (11.3)$$

$$a_2 \approx K_2 \frac{\rho}{A} Z \quad (11.4)$$

avec K_1 et K_2 des constantes.

Ces équations sont des approximations qui correspondent cependant bien aux mesures expérimentales [Alva 76]. La tomographie X consiste à mesurer l'intégrale de $\mu(E)$ sur une projection complète. Cela revient à intégrer les coefficients a_1 et a_2 sur cette même projection.

$$\int \mu(x, y; E) dS = \int a_1(x, y) \frac{1}{E^3} dS + \int a_2(x, y) f_{KN}(E) dS \quad (11.5)$$

ou,

$$\int \mu(x, y; E) dS = A_1 \frac{1}{E^3} + A_2 f_{KN}(E) \quad (11.6)$$

La reconstruction des coefficients $a_1(x, y)$ et $a_2(x, y)$ nécessite la mesure de A_1 et A_2 dans chaque point des projections de l'objet. Cela implique que deux jeux de données indépendants soient disponibles en chaque point. Une même projection acquise à deux énergies (ou avec deux spectres énergétiques différents, dans le cas de sources polychromatiques) permet d'obtenir ces deux jeux d'informations. En effet, les intensités transmises, mesurées derrière l'objet aux énergies E_1 et E_2 valent respectivement :

$$I(A_1, A_2; E_1) = T \int S(E_1) \exp[A_1/E_1^3 - A_2 f_{KN}(E_1)] dE_1 \quad (11.7)$$

$$I(A_1, A_2; E_2) = T \int S(E_2) \exp[A_1/E_2^3 - A_2 f_{KN}(E_2)] dE_2 \quad (11.8)$$

avec T , le temps de mesure total et $S(E_1)$ et $S(E_2)$, les spectres énergétiques utilisés. Ces spectres peuvent être produits de différentes manières. Il peut s'agir de sources monochromatiques provenant de radioisotopes ou d'un rayonnement synchrotron par exemple. Dans ce cas, la résolution du système se simplifie de manière importante. Les spectres peuvent également être polychromatiques et provenir de différentes filtrations appliquées à une même source. Enfin, un détecteur résolu en énergie peut permettre de discriminer le signal en fonction d'un seuil énergétique préalablement

défini et qui divise le signal $I(A_1, A_2; E)$ en deux [Alva 76]. Quelque soit la forme de $S(E_1)$ et $S(E_2)$, si le déterminant de la matrice

$$J = \begin{pmatrix} \partial I_1 / \partial A_1 & \partial I_1 / \partial A_2 \\ \partial I_2 / \partial A_1 & \partial I_2 / \partial A_2 \end{pmatrix}$$

est non nul, les intégrales 11.7 et 11.8 peuvent être résolues. Une fois que les coefficients intégrés A_1 et A_2 sont connus pour toutes les projections, les fonctions $a_1(x, y)$ et $a_2(x, y)$ peuvent être reconstruites de la même manière que dans un système CT conventionnel. A partir de là, les cartes de ρ et de Z de l'objet sont extraites.

Torikoshi et al. montrent en 2003, l'intérêt du rayonnement synchrotron pour appliquer la technique. Ils présentent le design de leur ligne de lumière dont les principales modifications pour cette application viennent de l'utilisation d'un cristal monochromateur double associé à un filtre tournant qui sélectionne alternativement deux énergies distinctes. Pour chaque projection de l'objet, deux images en transmission sont prises successivement aux deux énergies (40 et 80 keV). Un détecteur 2D est également utilisé. Les auteurs extraient les informations de densité et de numéro atomique des éléments constituant un fantôme équivalent tissus (composé de graisse, tissus mous, muscles et os compact). La figure 11.2 illustre la différence de contraste entre les images basées sur les coefficients d'atténuation μ ou sur les densités électroniques ρ_e et les numéros atomiques effectifs Z_{eff} .

Les valeurs de ρ_e et Z_{eff} sont parfaitement corrélées aux valeurs théoriques avec un écart inférieur au % dans les deux cas. L'accord est systématiquement meilleur dans les mélanges liquides que dans les échantillons solides. Du point de vue du contraste, les images de ρ_e et Z_{eff} améliorent significativement la qualité des images. Les parois acryliques délimitant les inserts dans le tissu mou (peu visibles sur les images de μ) présentent une forte densité électronique par rapport aux autres éléments. A l'inverse, elles présentent les plus faibles valeurs de Z [Tori 03]. Le rayonnement produit par un synchrotron présente un flux suffisamment intense pour pouvoir exploiter une fine bande passante de son spectre. Le caractère monochromatique des faisceaux ainsi générés permet d'améliorer la technique de tomographie à deux énergies en s'affranchissant des problèmes de durcissement de faisceaux et en utilisant des valeurs précises de $\mu(E)$ pour la reconstruction des images.

11.1.2 Application pour la décomposition d'un mélange d'éléments

La tomographie à deux énergies est, dans notre étude, utilisée pour la quantification d'éléments connus mélangés dans un même milieu. Le principe de cette application est le même que celui visant à extraire les propriétés de densité ρ et de numéro atomique Z des composés [Lehm 81]. Mais cette fois ci, on ne cherche plus à retrouver ces propriétés. On s'appuie justement sur elles (et plus précisément sur les coefficients d'atténuation qui sont connus et tabulés en fonction de E pour de nombreux matériaux ($Z = 1 - 92$) [Hubb 06]) pour retrouver leurs fractions volumiques en chaque point de l'image [Liu 09].

Dans le cas d'un matériau composite, son coefficient d'atténuation linéique s'exprime en fonction

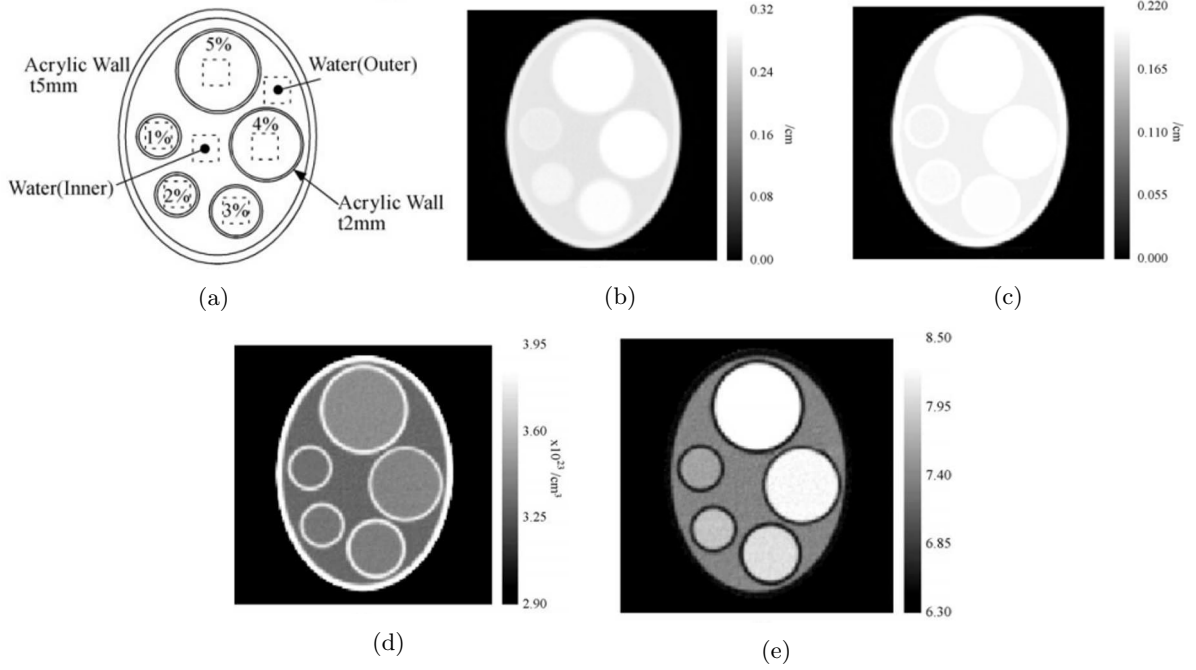


FIGURE 11.2 – (a) Représentation schématique d’un fantôme tête contenant cinq inserts remplis d’une solution de K_2HPO_4 à différentes concentrations. Images des coefficients d’atténuation d’un fantôme tête pour (b) un faisceau de 40 keV et (c) un faisceau de 80 keV. Images de (d) la densité électronique ρ_e et (e) des numéros atomiques effectifs Z_{eff} du même fantôme, issues d’une tomographie à deux énergies. Figures extraites de [Tori 03].

des coefficients de chaque composé M_i et de leur fraction volumique f_{M_i} [Vine 87].

$$\mu_{mix} = \mu_{M_1} f_{M_1} + \mu_{M_2} f_{M_2} + \dots + \mu_{M_n} f_{M_n} \quad (11.9)$$

$$f_{M_i} = \frac{v_{M_i}}{v_{tot}} \quad (11.10)$$

Dans le cas d’un ”mélange idéal” (*i.e* $\sum_{i=1}^n f_{M_i} = 1$), la tomographie à deux énergies permet de reconstruire les images des fractions volumiques associées à chaque élément. Elles sont extraites du système de trois équations à trois inconnues suivant :

$$y = \begin{cases} \mu_{E_1} = \mu_{M_1,E_1} f_{M_1} + \mu_{M_2,E_1} f_{M_2} + \mu_{M_3,E_1} f_{M_3} \\ \mu_{E_2} = \mu_{M_1,E_2} f_{M_1} + \mu_{M_2,E_2} f_{M_2} + \mu_{M_3,E_2} f_{M_3} \\ f_{M_1} + f_{M_2} + f_{M_3} = 1 \end{cases} \quad (11.11)$$

Les coefficients d’atténuation linéiques μ_{E_1} et μ_{E_2} sont mesurés à partir des tomographies réalisées aux énergies E_1 et E_2 respectivement et les coefficients μ_{M_i,E_j} sont tabulés et disponibles depuis le NIST (National Institute of Standards and Technology [Hubb]).

La troisième équation $f_{M_1} + f_{M_2} + f_{M_3} = 1$ n’est vraie que dans le cas de ”solutions idéales”. Cette notion d’idéalité a été initialement décrite par *François M. Raoult*. Elle décrit un mélange

pour lequel les propriétés des différents composés sont conservées. Lorsque deux composés A et B sont mélangés, les forces moléculaires liant les molécules A entre elles et les molécules B entre elles, peuvent être modifiées. Selon que ces forces sont amplifiées ou diminuées, on observe des écarts positifs ou négatifs au cas idéal. Dans ce cas, la somme des fractions volumiques de chaque composant n'est plus exactement égale au volume total du mélange. Cela peut entraîner un biais dans la résolution du système. Cependant, dans le cas de solutions liquides, cet écart reste faible. L'exemple le plus important pour illustrer ce phénomène est souvent celui de l'éthanol mélangé à de l'eau. Les molécules d'éthanol viennent s'imbriquer dans les molécules d'eau avec un meilleur coefficient de remplissage que celui des molécules d'eau ou d'éthanol indépendantes. Considérons par exemple le mélange d'une mole de chaque élément (soit 18 cm^3 d'eau et 58 cm^3 d'éthanol), le volume total du mélange sera égal à 74.4 cm^3 et non 76, induisant un écart de 2.1%. Cet écart dépend des concentrations et des volumes de chaque composé [Coll]. Bien que l'exemple cité ici décrive un cas "extrême", l'écart sur le volume total n'est que de 2%. Dans les applications pour l'imagerie médicale, les mélanges d'AC ne conduisent pas à de telles différences et nous vérifierons que les volumes sont conservés dans le cas d'un mélange d'Ioméron[®] et de GdNPs.

La résolution du système d'équations (11.1) voxel à voxel permet de retrouver f_{M_i} dans chaque voxel de l'image et par conséquent, les concentrations des trois matériaux. Nous simplifions ici l'écriture du système en utilisant les termes E_1 et E_2 pour désigner les énergies choisies pour l'imagerie. Ces termes doivent être remplacés par $\int S(E_j)dE_j$ lorsqu'un faisceau polychromatique est utilisé.

Cette méthode de différentiation des éléments à l'intérieur d'un mélange a initialement été testée par *Wellington et al.* pour une application en pétrochimie où le but était d'évaluer la qualité de réservoirs de pétrole. L'analyse de la composition d'un fluide contenu dans ces réservoirs permet d'en évaluer la porosité [Vine 87]. Dans leur étude, du CO_2 est lentement injecté dans un réservoir contenant différentes phases d'eau et d'huile. La figure 11.3 représente la distribution des différents éléments, simulée ou imagée par tomographie à deux énergies. Les scans ont été réalisés à l'aide d'un scanner conventionnel. Les deux spectres énergétiques ont été obtenus par différentes filtrations du spectre total. Les auteurs montrent une bonne corrélation entre les simulations et les images, mettant ainsi en avant le potentiel de la technique pour la séparation d'éléments dans un mélange.

Mickael et al. utilisent la méthode pour l'analyse de fantômes équivalents tissus et quantifient les différences entre les fractions volumiques mesurées et réelles. Des simulations numériques sont effectuées sur un fantôme composé d'air, de calcium hydroxyapatite, de muscle, de graisse et de collagène. Un fantôme réel composé d'eau, d'éthanol et de chlorure de calcium est imagé par un scanner conventionnel avec deux spectres de 96 et 125 kVp respectivement. Les simulations numériques donnent d'excellents résultats puisque les concentrations sont déterminées avec un maximum d'écart de $\pm 2\%$ par rapport aux valeurs réelles. Les plus grandes erreurs concernent la mélange de graisse et de muscles, où les coefficients d'atténuation sont proches pour les énergies choisies [Mich 92]. Les mesures expérimentales donnent de très bons résultats pour la distinction de deux éléments, indiquant que l'approximation faite par $\sum f_{M_i} = 1$ n'introduit pas une erreur importante dans le calcul des concentrations, malgré le fait que les éléments choisis soient l'eau et l'éthanol qui sont particulièrement connus pour ne pas constituer un mélange idéal [Coll]. Cependant, une erreur importante est introduite lorsqu'un troisième élément est ajouté au mélange. Les erreurs ne sont

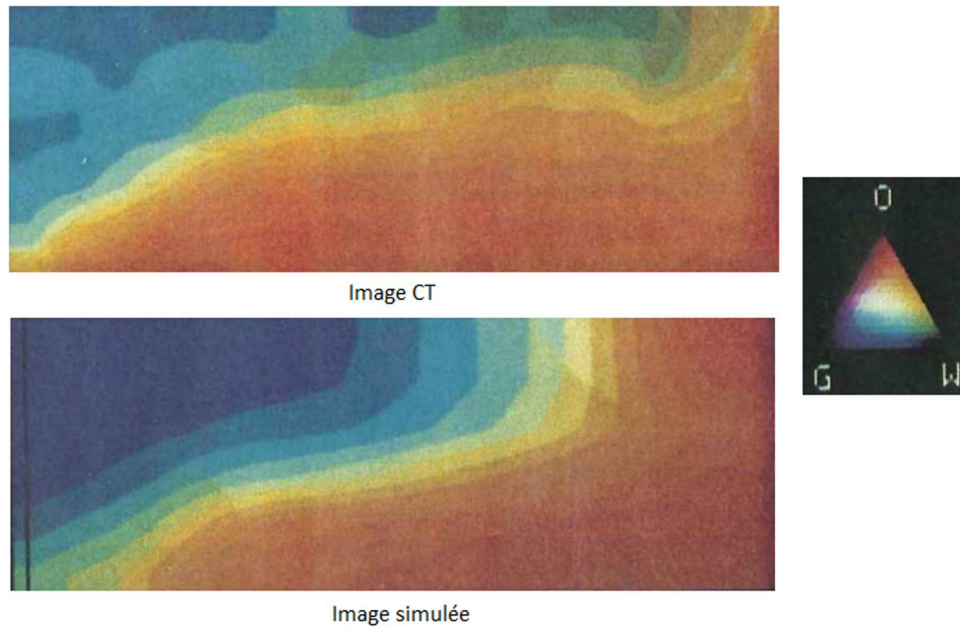


FIGURE 11.3 – Comparaison de l'image CT à deux-énergies et de l'image simulée d'un mélange de trois fluides : O, pour oil ; G, pour CO_2 et W, pour water. Figure extraite de [Well 87].

pas aléatoires mais systématiques. Elles peuvent donc être réduites par différents moyens comme par exemple, un choix des énergies plus judicieux qui permettrait d'augmenter la différence entre les coefficients d'atténuation des différents éléments et faciliterait la résolution du système [Talb 80].

D'une manière plus générale, la tomographie à deux énergies peut être limitée par trois principaux facteurs :

- **Le rayonnement diffusé**, qui tend à diminuer le rapport signal sur bruit (SNR, pour Signal to Noise Ratio) et qui peut être réduit par la collimation de la source ou mieux encore, par l'utilisation d'un rayonnement faiblement divergeant (un synchrotron par exemple), qui permet de placer le détecteur loin de l'objet et de s'en affranchir en grande partie.
- **L'utilisation de spectres polychromatiques** nécessite de faire une estimation sur le calcul des coefficients d'atténuation linéiques, à partir de l'énergie moyenne du spectre. Le caractère quantitatif est à l'inverse totalement conservé avec des faisceaux monochromatiques.
- **Les artefacts de durcissement de faisceau** : A mesure que les photons pénètrent dans la matière, leur spectre énergétique est modifié (les composantes de basse énergie étant plus atténuées que les autres), entraînant une erreur sur la détermination de $\mu(E)$. L'utilisation de RX monochromatiques permet de s'affranchir de ces effets.

11.2 Vers une application médicale

Du fait de ses avantages importants pour l'augmentation de la qualité des images CT, la technique de double énergie commence peu à peu à faire l'objet d'études *in vivo* (cliniques ou pré-cliniques) pour le diagnostic médical. L'imagerie de la vascularisation suite à une injection d'un

agent de contraste, est pour le moment, la principale application. Une étude conduite sur des patients a permis de valider l'utilisation clinique de la méthode, avec des doses inférieures ou égales aux seuils tolérés [John 07]. Les scans ont été réalisés successivement avec un scanner conventionnel dont les spectres ont été définis à 80 et 140 kVp . L'analyse des données permet la distinction de deux éléments dans les images : soit l'iode (AC) séparé des tissus, soit le collagène (présent dans les tendons et ligaments) dissocié lui aussi des tissus. Les auteurs montrent que l'image d'un agent de contraste est possible dans le cerveau, les poumons, le foie et les reins. Les structures osseuses peuvent être retirées des données brutes (avant la reconstruction) pour améliorer la qualité de la reconstruction de la distribution de l'AC. La figure 11.4 illustre les différents scans réalisés. Les auteurs ne présentent pour le moment pas d'images où trois éléments sont séparés, mais se limitent à la séparation de deux éléments à partir des deux scans.

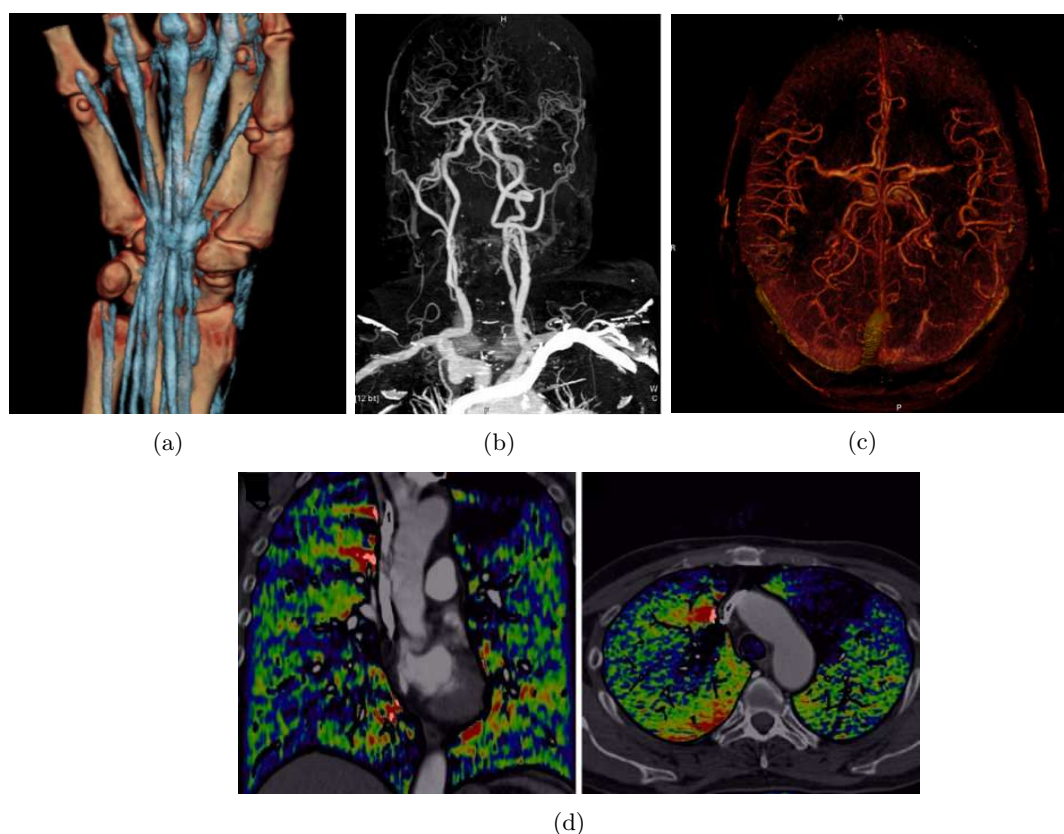


FIGURE 11.4 – Images produites par la méthode de tomographie à deux énergies décrite par *Johnson et al.* [John 07] et représentant (a) les ligaments et tendons d'une main, (b) la vascularisation de la tête (vue en coupe sur l'image (c)) et (d) la perfusion des poumons mise en évidence par un AC iodé.

Dans une étude pré-clinique, une tomographie à trois énergies a été réalisée sur un petit animal (rat) pour imager sa vascularisation (mise en évidence par un AC), son architecture osseuse et ses tissus mous. Les auteurs utilisent trois énergies dans le but d'affiner le calcul des coefficients d'atténuation des différents éléments (en théorie, deux énergies suffisent). Les scans sont cette fois

encore réalisés à partir de spectres polychromatiques issus d'un scanner conventionnel (70 kVp non filtré, 96 kVp filtré par 0.3 mm de Pb et 140 kVp filtré par 1.45 mm de Cu). Un processus itératif est ajouté à l'algorithme de reconstruction pour minimiser la différence entre le coefficient d'atténuation linéique calculé et celui mesuré dans les images CT. Lorsque cette différence est minimale, les fractions volumiques f_{M_i} sont extraites de chaque voxel. Les valeurs de μ mesurées sont en très bon accord avec les valeurs calculées, avec un écart moyen de $2.8 \pm 0.8\%$. La figure 11.5 présente les images. Chacune des structures est extraite avec une très bonne résolution spatiale. La technique permet de distinguer les os et la distribution de l'AC des tissus mous avec une précision meilleure que 90% [Gran 08]. L'utilisation d'une troisième énergie permet d'augmenter la précision dans le calcul des μ et de diminuer le bruit. Cependant, les images étant prises successivement, un troisième scan augmente indéniablement la dose délivrée à l'animal.

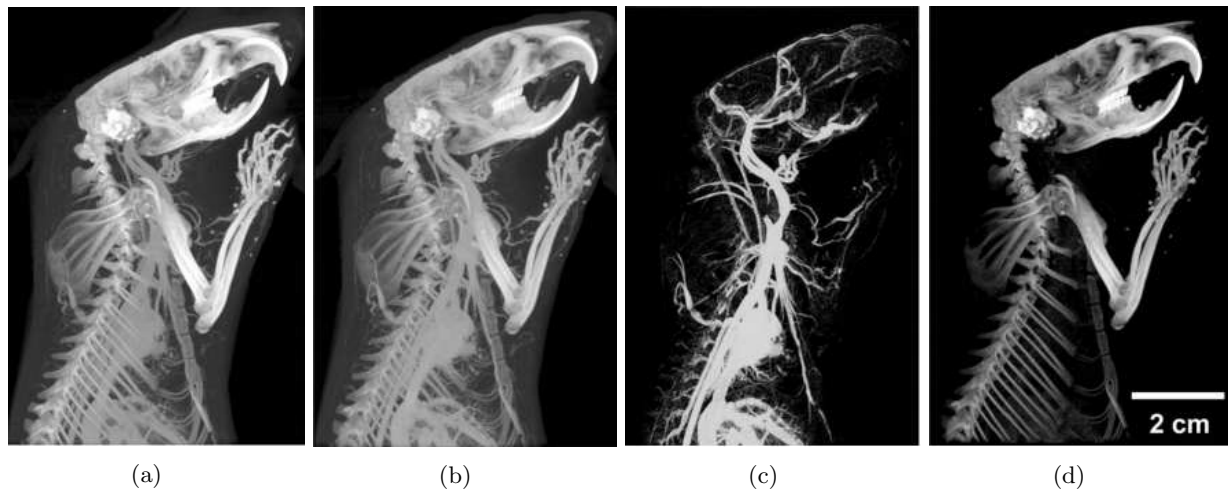


FIGURE 11.5 – Décomposition du squelette et de la vascularisation mise en évidence par un AC chez un rat. L'image (a) représente le volume CT acquis à 96 kVp et l'image (b) celui acquis à 140 kVp . Les figures (c) et (d) représentent respectivement la distribution de l'AC et le squelette isolés à partir de la combinaison des jeux de données aux deux énergies. Figures extraites de [Gran 08].

11.3 Conclusion et problématique

Dans tous ces exemples *in vivo*, les études se concentrent sur la distinction d'un seul agent de contraste dans les tissus (deux éléments au maximum). L'ajout d'un élément supplémentaire semble augmenter les incertitudes de mesures des concentrations des différents éléments [Mich 92] et nécessite une acquisition à une troisième énergie pour obtenir une qualité d'image satisfaisante *in vivo* avec un scanner générant des spectres polychromatiques [Gran 08]. D'autre part, la grande majorité des études conduites nécessite des acquisitions successives aux différentes énergies pour obtenir la totalité des données. *In vivo*, ce caractère successif n'est pas satisfaisant car il entraîne une multiplication des scans, et donc une augmentation des artefacts liés aux mouvements des organes internes de l'animal (coeur, poumons, etc).

Dans cette dernière partie, nous proposons de mettre en place une méthode équivalente sur la ligne de lumière ID17 de l'ESRF, avec pour but principal d'imager de manière quantitative trois éléments mélangés dans un même volume. Cette méthode va dans un premier temps être caractérisée en termes de limites et de précisions, grâce à des mesures sur fantômes essentiellement. Nos principaux objectifs sont de valider les caractères quantitatif et simultané de la technique, puis de caractériser la distribution et l'élimination des GdNPs injectées par CED dans un gliome implanté chez le rat et imagé par prise de contraste iodé (injection intraveineuse d'un AC iodé). Cette méthode nous permettrait de répondre à l'objectif (plus lointain) de pouvoir réaliser la dosimétrie précise d'un traitement de radiothérapie synchrotron combiné à une injection de nanoparticules.

Chapitre 12

Méthodes expérimentales pour l'imagerie d'éléments lourds dans un gliome

Sommaire

12.1 Tomographie à deux énergies	188
12.1.1 Set-up expérimental	188
12.1.2 Algorithme de séparation des éléments	189
12.1.3 Couple d'énergies optimales et limite de détection	191
12.1.4 Études sur fantômes	195
12.1.5 Etudes <i>in vivo</i>	197
12.2 Caractérisation du volume tumoral	198
12.2.1 Imagerie des tumeurs <i>in vivo</i>	199
12.2.2 Imagerie des tumeurs <i>post-mortem</i>	200

L'ensemble des méthodes utilisées dans cette partie est détaillé dans ce chapitre. Les points principaux concernent la préparation des animaux, l'imagerie simultanée des agents de contraste par tomographie à deux énergies et l'imagerie haute résolution des tumeurs *post-mortem* (où deux techniques seront comparées : interférométrie X et IRM anatomique). Chaque méthode expérimentale ou d'analyse sera expliquée le plus précisément possible.

12.1 Tomographie à deux énergies

12.1.1 Set-up expérimental

12.1.1.1 Monochromateur

Pour implémenter la méthode de tomographie à deux énergies (cf. section 11.1, page 177), un monochromateur dédié (appelé monochromateur d'angiographie) a été utilisé sur la ligne de lumière ID17. Ce monochromateur, est constitué d'un cristal de Silicium (géométrie de Laue) organisé selon un réseau (1 1 1), dont un plan est représenté par la figure 12.1(a). La courbure de ce cristal et un système de collimation permettent de sélectionner un spectre énergétique avec une bande passante de 450 eV. Un séparateur est inséré derrière le cristal pour diviser le faisceau en deux parties quasi-monochromatiques (150 eV de bande passante chacune). Les énergies moyennes de ces faisceaux sont distinctes d'environ de 250 eV et le set-up est ajusté de manière à positionner l'échantillon au niveau de leur plan d'intersection (cf. Fig. 12.1(b)). Dans la pratique, ce plan est défini par la largeur du faisceau, s'étend sur une longueur d'une dizaine de centimètres et mesure environ 0.7 mm de hauteur. L'acquisition des images aux deux énergies se fait simultanément. Les faisceaux n'étant pas "mobiles", l'échantillon est placé sur un support motorisé qui permet la rotation nécessaire à l'acquisition des volumes en 3D. Pour maximiser les différences d'absorption dans l'échantillon entre les deux faisceaux, tout en conservant un positionnement des faisceaux compatible avec le support des échantillons, le monochromateur est réglé pour obtenir un spectre centré sur le K-edge de l'iode (33.17 keV).

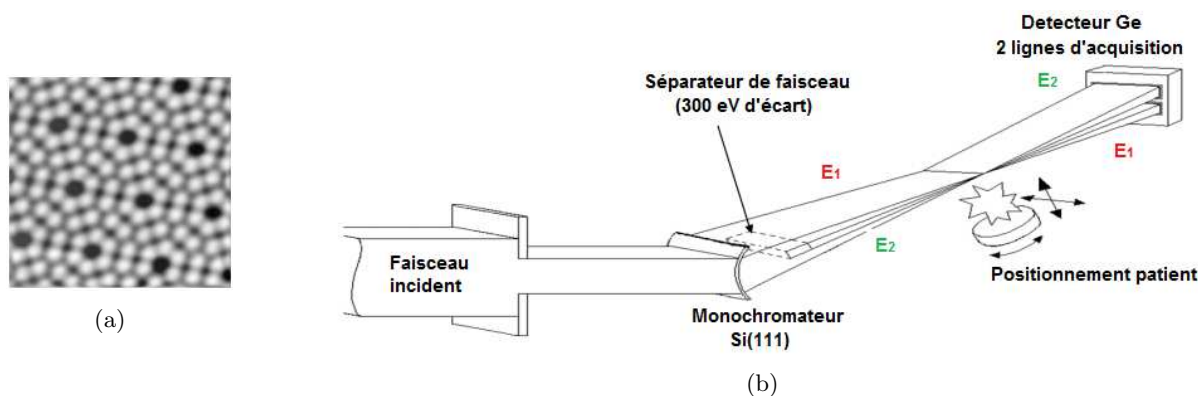


FIGURE 12.1 – (a) Plan d'un cristal de Silicium Si(111) qui constitue le monochromateur utilisé pour la tomographie à deux énergies. (b) Représentation schématique du monochromateur et du dispositif expérimental mis en place pour la tomographie à deux énergies. L'échantillon se situe à 7 m du monochromateur et à 6 m du détecteur.

12.1.1.2 Détecteur

La détection simultanée des deux jeux de données est nécessaire pour le succès de la technique. Le détecteur utilisé est un cristal de Germanium (Ge) monolithique dopé *p*, de 2 mm d'épaisseur,

150 mm de longueur et 20 mm de hauteur. Il est composé de deux lignes de 432 franges parallèles chacune, électriquement indépendantes pour permettre l'acquisition simultanée des deux images. La résolution spatiale horizontale est définie par la dimension des franges : 350 μm et la résolution spatiale verticale, par la hauteur du faisceau. Son efficacité a été testée en fonction de l'énergie des RX . Elle approche 100% à 33 keV et vaut environ 45% à 90 keV [Pete 03]. La figure 12.2 précise les caractéristiques géométriques du détecteur.

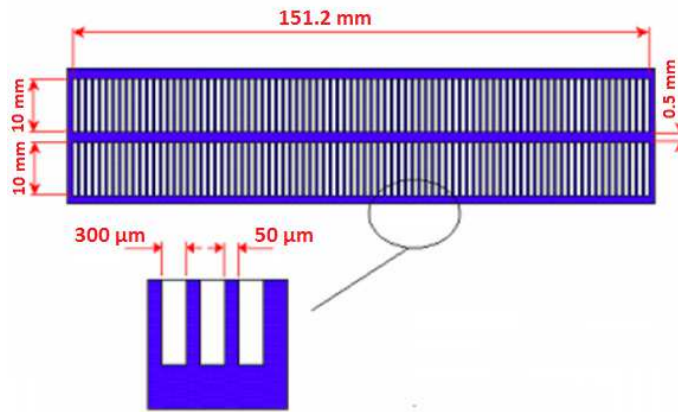


FIGURE 12.2 – Représentation schématique du détecteur au Germanium composé de deux lignes indépendantes de 432 franges parallèles chacune, permettant l'acquisition simultanée de deux images. La résolution spatiale dépend de la taille des pixels qui vaut 350 μm .

12.1.1.3 Paramètres d'acquisition

Que ce soit pour les images de fantômes ou pour les images d'animaux, l'objet cartographié est placé entre le monochromateur et le détecteur, à 6 m de ce dernier, sur un support motorisé qui assure la rotation. Une image en transmission est premièrement acquise pour repérer les positions et définir la région d'intérêt. Ensuite, le volume 3D est scanné avec les paramètres d'acquisition définis dans le tableau 12.1. Pour étudier l'élimination des solutions d'iode et de gadolinium *in vivo*, un premier scan est acquis environ 10-15 min après l'injection (le temps que l'AC puisse diffuser jusque dans la tumeur), puis des scans supplémentaires sont acquis toutes les 10 min et sur une durée totale de 2h. L'intégralité de l'expérience est répétée sur trois animaux différents, dénommés D, E et F.

12.1.2 Algorithme de séparation des éléments

L'algorithme de séparation des éléments a été implémenté sous IDL (Interactive Data Language software). Il est construit sur la même logique que celle décrite par *Vinegar et al.* Les valeurs des coefficients d'atténuation massiques $(\mu/\rho)_i$ et de densité (d_i) de chaque éléments (M_i) sont d'abord recherchées dans une base de données pour les énergies E_1 et E_2 . Les images acquises

Paramètres	
E_1 (keV)	33.02
E_2 (keV)	33.32
Vitesse de rotation ($^\circ/s$)	180
Nb projections	720
Dimensions de l'image (px)	432×432
Résolution horizontale (cm)	0.035
Résolution verticale (cm)	0.5
Dose (Gy/scan)	0.14

TABLE 12.1 – Paramètres d'acquisition des images pour la tomographie à deux énergies. La dose délivrée à la peau de l'animal est estimée à partir des formules 12.2 et 12.4, p. 192.

aux deux énergies E_1 et E_2 sont ensuite fournies en entrées au système. A partir de ces données, le système d'équations (11.11) (décrit à la page 180) est construit pour chaque voxel p_{xy} . Il est ensuite inversé et résolu voxel à voxel. Les images de concentration des différents éléments recherchés sont reconstruites à partir des valeurs de fractions volumiques (f_{M_i}) calculées. La figure 12.3 donne une représentation schématique de l'algorithme.

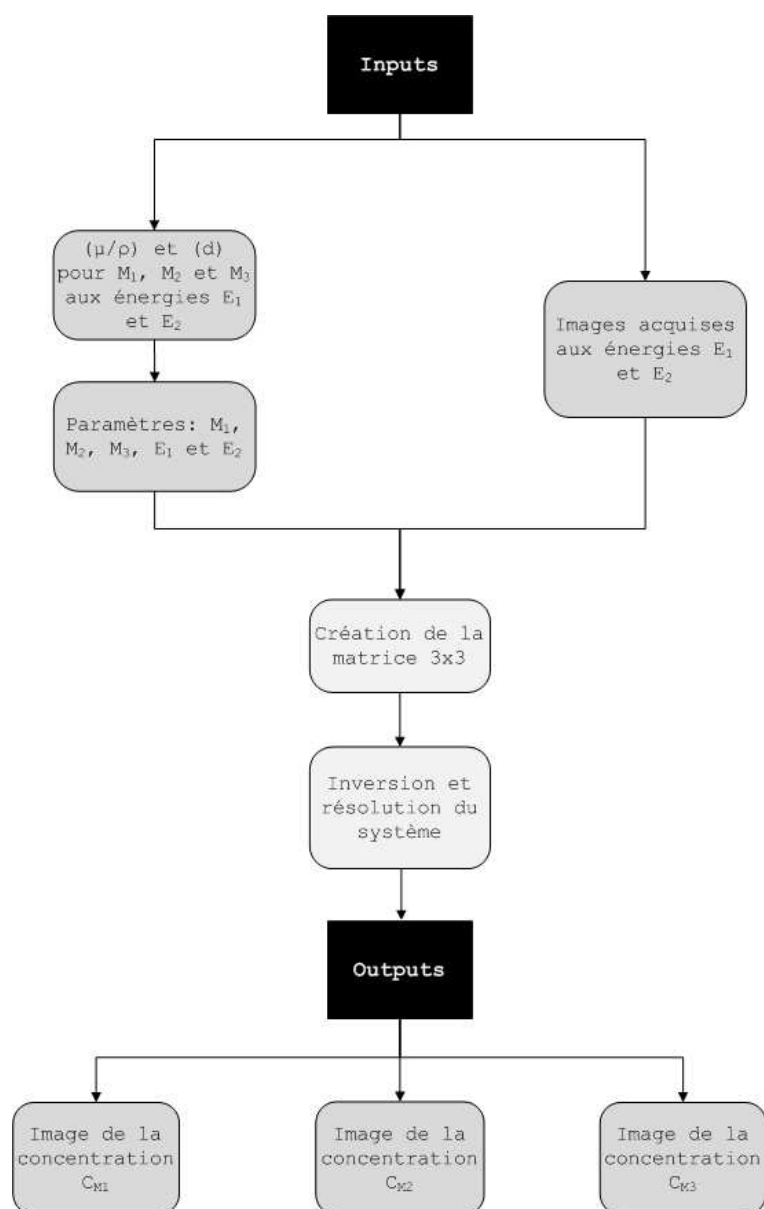


FIGURE 12.3 – Représentation schématique de l’algorithme de séparation des éléments implémenté sous IDL (Interactive Data Language software).

12.1.3 Couple d’énergies optimales et limite de détection

La tomographie à deux énergies implique d’acquérir deux scans de l’objet avec deux faisceaux d’énergies différentes. Nous avons vu dans la partie 11.1 (p. 177) que l’utilisation de faisceaux monochromatiques permet de s’affranchir des artéfacts de durcissement de faisceau et d’augmenter la précision sur les mesures des fractions massiques des différents éléments recherchés. Le rayonnement synchrotron (à la fois monochromatique et intense) paraît donc idéal pour la tomographie à deux énergies. Mais quelles énergies doit-on choisir pour optimiser la qualité des images ? Et quelle sensibilité peut-on espérer avec notre système de mesure ? La réponse à cette question dépend bien

sûr des éléments que l'on souhaite imager. Pour déterminer le couple d'énergies optimum pour la détection de l'iode et du gadolinium dans les tissus, la maximisation de la fonction FOM_{moy} (pour Figure Of Merit moyenne¹) a été utilisée et évaluée à partir d'un fantôme cylindrique numérique rempli d'iode, de gadolinium et d'eau.

$$FOM_{moy} = \frac{SNR_{M_2} + SNR_{M_3}}{2\sqrt{D_{E_1} + D_{E_2}}} \quad (12.1)$$

La fonction FOM ne prend en compte que deux éléments, M_2 et M_3 , qui correspondent aux deux éléments lourds que l'on souhaite quantifier (iode et gadolinium respectivement). L'élément M_1 représente dans notre cas, l'eau (ou les tissus) dont la concentration ne présente pas d'intérêt pour notre étude. Le calcul de la fonction FOM se base sur l'approche analytique de *Graeff* et ses collaborateurs, explicitée dans le cadre de l'évaluation des erreurs faites sur la mesure de fer contenu dans le foie et quantifiée par une méthode de tomographie à deux énergie [Oelc 96]. Le formalisme que nous présentons ici est fortement inspiré de cette méthode. Il nous permet de calculer les grandeurs D_{E_j} et SNR_{M_i} , nécessaires pour le calcul de la fonction FOM .

Calcul de D_{E_j} :

D_{E_j} est la dose déposée à la surface de l'objet pour le scan acquis à l'énergie E_j :

$$D_{E_j} = 1000 \times \frac{N_0 E_j}{l \cdot h} \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E_j} \quad (12.2)$$

où l est la taille du fantôme (de 3 à 23 cm dans notre étude), h est la hauteur du faisceau (0.3 cm) et $(\mu_{en}/\rho)_{E_j}$, le coefficient massique d'absorption de l'eau à l'énergie E_j ($cm^2 \cdot g^{-1}$). N_0 représente le nombre total de photons arrivant sur l'objet, nécessaire pour acquérir l'image. Il dépend de la précision souhaitée dans l'image (donc de N_r , le nombre de photons incidents reçu par pixel (sans objet entre la source et le détecteur)).

$$N_0 = \frac{l}{w} m \cdot N_r \quad (12.3)$$

où m est le nombre de projections équidistantes autour de l'objet (720) et w est la taille d'un pixel (0.035 cm). Le calcul de N_r a été estimé pour le système de détection utilisé dans l'étude (détecteur au Germanium décrit plus haut, p. 188) par *Elleume et al.* [Elle 02] :

$$N_r = e^{(x_{Be} \cdot \mu_{Be})} \frac{M \cdot Q_{min} \cdot e_p \times 128}{E_j [1 - e^{(-x_{Ge} \mu_{Ge})}] \bar{e} \times gain} \quad (12.4)$$

M indique la mesure du détecteur (de 1 à 65536 bits), E_j , l'énergie des photons (J), Q_{min} , la charge minimale détectable ($2.10^{-15} C$), e_p , l'énergie minimum nécessaire pour créer une paire électron/trou dans le germanium (2.98 eV), \bar{e} , la charge élémentaire ($1.6.10^{-19} C$), $gain$, le gain du détecteur, μ_i , les coefficients d'atténuation linéiques (cm^{-1}) et x_i , les épaisseurs traversées de Beryllium (0.1 cm) et de Germanium (0.2 cm) (l'atténuation de l'air est négligée). La dose et la taille du fantôme sont les deux seuls paramètres variables dans l'étude de la dépendance de la FOM à ces grandeurs.

1. la fonction FOM est calculée pour chaque pixel de l'image

Calcul de SNR_{M_i} :

Le rapport signal sur bruit pour le matériau M_i (SNR_{M_i}), correspond comme son nom l'indique, au rapport entre le signal (f_{M_i}) et le bruit ($\sigma_{f_{M_i}}$) :

$$SNR_{M_i} = \frac{f_{M_i}}{\sigma_{f_{M_i}}} \quad (12.5)$$

(f_{M_i}) est la fraction massique de l'élément i . Elle est mesurée dans l'image et ($\sigma_{f_{M_i}}$) représente l'écart-type associé à cette mesure. Plusieurs hypothèses sont admises dans la méthode de *Graeff* pour le calcul de (f_{M_i}) et ($\sigma_{f_{M_i}}$) :

- L'objet considéré est cylindrique.
- L'atténuation dans l'objet est définie par un coefficient d'atténuation moyen : $\bar{\mu}$.
- La bande passante des faisceaux $\Delta E/E$ étant de l'ordre de 10^{-3} , μ_E est considéré constant.
- Le bruit électronique du détecteur est négligé, car il a été évalué comme étant très faible (l'équivalent de quelques photons de 33 keV). Seul le bruit photonique influence la détection des éléments. La statistique de comptage (proportionnelle à la dose D_{E_i}) est le principal paramètre limitant.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent (cf. 11.1.2, p. 179), les images acquises aux deux énergie E_1 et E_2 permettent de construire le système suivant :

$$\begin{pmatrix} \mu_{E_1} \\ \mu_{E_2} \\ 1 \end{pmatrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} \mu_{M_1,E_1} & \mu_{M_2,E_1} & \mu_{M_3,E_1} \\ \mu_{M_1,E_2} & \mu_{M_2,E_2} & \mu_{M_3,E_2} \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}}_{\mathbf{A}} \begin{pmatrix} f_{M_1} \\ f_{M_2} \\ f_{M_3} \end{pmatrix} \quad (12.6)$$

où \mathbf{A} est la matrice des coefficients d'atténuation linéique tabulés pour chaque élément et chaque matériau (μ_{M_i,E_j}).

Par inversion du système, nous pouvons calculer les fractions massiques (f_{M_i}) relatives aux différents matériaux que l'on souhaite extraire des images.

$$\begin{pmatrix} f_{M_1} \\ f_{M_2} \\ f_{M_3} \end{pmatrix} = \frac{1}{|\mathbf{A}|} \times cof(^T \mathbf{A}) \begin{pmatrix} \mu_{E_1} \\ \mu_{E_2} \\ 1 \end{pmatrix} \quad (12.7)$$

où $|\mathbf{A}| = \det(\mathbf{A})$ est le déterminant de la matrice \mathbf{A} et $cof(^T \mathbf{A})$ est la matrice des cofacteurs transposée. Les équations ci dessous donnent leurs expressions complètes :

$$\det(\mathbf{A}) = \mu_{M_1,E_1}(\mu_{M_2,E_2} - \mu_{M_3,E_2}) + \mu_{M_2,E_1}(\mu_{M_3,E_2} - \mu_{M_1,E_2}) + \mu_{M_3,E_1}(\mu_{M_1,E_2} - \mu_{M_2,E_2}) \quad (12.8)$$

$$cof(^T \mathbf{A}) = \begin{pmatrix} \mu_{M_2,E_2} - \mu_{M_3,E_2} & \mu_{M_3,E_1} - \mu_{M_2,E_1} & \mu_{M_2,E_1} \cdot \mu_{M_3,E_2} - \mu_{M_3,E_1} \cdot \mu_{M_2,E_2} \\ \mu_{M_3,E_2} - \mu_{M_1,E_2} & \mu_{M_1,E_1} - \mu_{M_3,E_1} & \mu_{M_3,E_1} \cdot \mu_{M_1,E_2} - \mu_{M_1,E_1} \cdot \mu_{M_3,E_2} \\ \mu_{M_1,E_2} - \mu_{M_2,E_2} & \mu_{M_2,E_1} - \mu_{M_1,E_1} & \mu_{M_1,E_1} \cdot \mu_{M_2,E_2} - \mu_{M_2,E_1} \cdot \mu_{M_1,E_2} \end{pmatrix}$$

(12.9)

La variance associée aux fractions massiques ($\sigma^2(f_{M_i})$) s'obtient en appliquant la formule de propagation des erreurs au système 12.7, pour lequel nous négligeons l'incertitude sur les valeurs tabulées (μ_{M_i, E_j}) :

$$\sigma^2(f_{M_i}) = \sum_j \left(\frac{\partial f_{M_i}}{\partial \mu_{E_j}} \right)^2 \sigma^2(\mu_{E_j}) \quad (12.10)$$

avec

$$\frac{\partial f_{M_2}}{\partial \mu_{E_1}} = \frac{\mu_{M_3, E_2} - \mu_{M_1, E_2}}{|\mathbf{A}|} \quad (12.11)$$

$$\frac{\partial f_{M_2}}{\partial \mu_{E_2}} = \frac{\mu_{M_1, E_1} - \mu_{M_3, E_1}}{|\mathbf{A}|} \quad (12.12)$$

$$\frac{\partial f_{M_3}}{\partial \mu_{E_1}} = \frac{\mu_{M_1, E_2} - \mu_{M_2, E_2}}{|\mathbf{A}|} \quad (12.13)$$

$$\frac{\partial f_{M_3}}{\partial \mu_{E_2}} = \frac{\mu_{M_2, E_1} - \mu_{M_1, E_1}}{|\mathbf{A}|} \quad (12.14)$$

Le matériau M_1 correspondant à l'eau (ou aux tissus), ne sera pas considéré ici puisque la précision sur cette mesure n'a pas de réel intérêt pour l'étude.

Finalement, il ne reste plus qu'à estimer ($\sigma^2(\mu_{E_j})$) pour terminer le calcul. Le coefficient d'atténuation linéique $\mu(x, y)$, mesuré dans un pixel (x, y) de l'image est issu de la somme pondérée du signal de chaque projection p , au croisement au niveau du pixel (x, y) en question. La projection p s'écrit comme le logarithme du rapport entre N et N_0 , le nombre de photons à la sortie de l'objet et celui à son entrée, respectivement.

$$p = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (12.15)$$

avec

$$N = N_0 \exp(\bar{\mu} \cdot l) \quad (12.16)$$

donc

$$\sigma^2(p) = \frac{1}{N_0} + \frac{1}{N} = \frac{1 + \exp(\bar{\mu} \cdot l)}{N_0} \quad (12.17)$$

La variance du coefficient d'atténuation reconstruit au centre de l'objet s'exprime en fonction $\sigma^2(p)$:

$$\sigma^2(\mu) = \frac{B}{mw^2} \sigma^2(p) = \frac{B(1 + \exp(\bar{\mu} \cdot l))}{mw^2 N_0} \quad (12.18)$$

où B est un facteur caractéristique de la fonction filtre (0.8 pour le filtre Rampe).

A partir de ces grandeurs, les fonctions FOM_{moy} et MDC (Minimum Detectable Concentration) peuvent être calculées pour n'importe quel élément imagé avec n'importe quel couple d'énergie. Ce calcul a été réalisé dans la gamme énergétique 30 - 85 keV, pour la détection d'un mélange d'iode et de gadolinium dans de l'eau (les deux éléments lourds étant présents à la concentration de 3 mg/mL chacun). La valeur la plus grande de FOM indique le couple d'énergies optimal tandis que la MDC donnera la concentration la plus petite détectable dans l'image. Elle est définie comme la

concentration donnant un signal cinq fois plus important que le bruit ($\sigma(C_{M_i})$), *i.e.*, un SNR égal à 5 (selon le critère de Rose).

$$MDC = 5 \cdot \sigma(C_{M_i}) \quad (12.19)$$

Nous rappelons ici que $C_{M_i} = f_{M_i} \times \rho_{M_i}$. L'écart-type ($\sigma(C_{M_i})$) est donc directement proportionnel à ($\sigma(f_{M_i})$).

12.1.4 Études sur fantômes

12.1.4.1 Fantômes virtuels

L'algorithme de séparation des éléments a tout d'abord été testé sur des images virtuelles, simulées pour différentes énergies de RX , avec le logiciel SNARK89. Ce logiciel est dédié à la reconstruction d'images 2D à partir de projections 1D et a été développé à l'origine pour tester les algorithmes de reconstruction. La documentation complète du logiciel est disponible sur <http://www.dig.cs.gc.cuny.edu/software/snark09>. Les paramètres de simulation ont été choisis de manière à correspondre au mieux à ceux de l'imagerie expérimentale. Le tableau 12.2 regroupe les différents paramètres d'entrée du logiciel. La dose totale délivrée à la surface de l'objet a varié entre 5 et 2000 mGy , selon l'étude, afin d'étudier la dépendance de la sensibilité de la méthode à ce paramètre. Le bruit électronique possiblement induit par le détecteur est négligé puisqu'il est infime dans notre système de détection [Elle 02].

Paramètres	
Objet	2 fantômes différents (cf. Fig. 12.4)
Taille de l'image (px)	432×432
Taille pixel (cm)	0.035
Source	Prise en compte de la faible divergence du faisceau d'ID17
Énergie (keV)	33.02, 33.32 ou 50.30 (+1% 3 ^{ième} harmonique)
Hauteur du faisceau (cm)	0.5
Dose en surface de l'objet (mGy)	Variable (entre 5 et 2000)
Géométrie du détecteur	Uniforme
Nb. projections	1480
Méthode de reconstruction	Réprojection filtrée

TABLE 12.2 – Paramètres d'entrée du logiciel de simulation d'images 2D SNARK89.

Deux fantômes virtuels différents ont été utilisés dans cette étude :

- **Fantôme 1** : Cylindre de plexiglass de 10 cm de diamètre et de 5 cm de hauteur. Ce fantôme contient neuf inserts cylindriques différents de 1.4 cm de diamètre chacun, à l'intérieur desquels des solutions d'iode et de gadolinium à différentes concentrations sont placées (cf. Fig. 12.4(a)). Ce fantôme est identique au fantôme réel scanné plus tard sur ID17 et les résultats de l'imagerie seront comparés aux résultats des simulations.

- **Fantôme 2** : Représentation simplifiée de la tête d'un rat porteur d'une tumeur cérébrale. Ce fantôme est circulaire (3 cm de diamètre). Le crâne est représenté par une épaisseur d'os de 0.5 cm. L'intérieur est rempli par un matériau équivalent tissu (donnée issue de l'ICRU4²) et une tumeur de 0.8 cm de diamètre contenant de l'iode (3 mg/mL) est ajoutée. L'injection par voie directe de gadolinium est simulée par la présence d'une région circulaire (0.4 cm) interne à celle de l'iode contenant uniquement du gadolinium (3 mg/mL), bordée par une région de 0.1 cm où se mélangent iode et gadolinium (aux mêmes concentrations de 3 mg/mL). La figure 12.4(b) illustre ce fantôme.

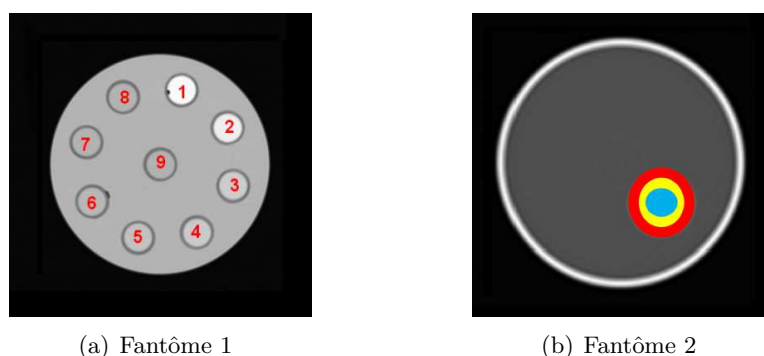


FIGURE 12.4 – Représentation des fantômes simulés : (a) **Fantôme 1** : Cylindre contenant 9 inserts remplis de mélange d'eau, d'iode et de gadolinium à différentes concentrations, (b) **Fantôme 2** : Tête d'un rongeur porteur d'un gliome et ayant reçu une injection intraveineuse d'iode (rouge, 3 mg/mL) et une injection directe de gadolinium (bleu, 3 mg/mL). La région marquée en jaune correspond à un mélange homogène d'iode et de gadolinium, 3 mg/mL également.

12.1.4.2 Fantôme réel

Les résultats des simulations sont confrontés aux résultats d'imagerie en termes de qualité d'images et de concentrations détectées. Un fantôme de plexiglass identique à celui représenté sur la figure 12.4(a) a été usiné pour l'étude. Des solutions liquides d'iode (AC Ioméron[®], 350 mg/mL) et de gadolinium (AC Dotarem[®], 0.5 mM (*i.e.* 78.6 mg/mL)) contenues dans des tubes en plastique de diamètre interne 1.37 cm, sont placées dans les inserts. Les concentrations théoriques et mesurées des différents AC dans chacun des tubes, sont discutées dans le chapitre suivant, à la page 212. Dans la discussion, nous ferons la distinction entre précision et exactitude des mesures. La précision sera estimée par l'écart-type associé à la mesure (simulée ou expérimentale) et donnera une indication sur la fiabilité de la mesure. L'exactitude sera estimée par l'écart relatif entre la mesure (simulée ou expérimentale) et la valeur théorique de la concentration de l'AC. La figure 12.5 schématise la nuance entre les deux grandeurs.

2. International Commission on Radiation Units and Measurements.

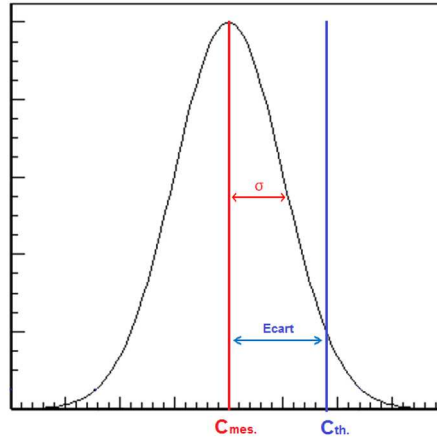


FIGURE 12.5 – Les mesures des concentrations des AC (simulations ou expériences) seront comparées aux concentrations théoriques et discutées en termes de précision (σ) et d’exactitude (Ecart relatif : $\frac{|C_{th.}-C_{mes.}|}{C_{th.}}$).

12.1.4.3 Mesure des concentrations d’éléments lourds

Les concentrations d’iode et de gadolinium ont été directement mesurées dans les images de concentrations générées par l’algorithme de séparation de éléments. Que ce soit pour les fantômes simulés ou réels, les concentrations ont été extraites à partir de ROIs rectangulaires de 1 cm de côté, placées au centre des inserts contenant les solutions d’éléments lourds. L’écart-type associé à la mesure a également été considéré.

12.1.5 Etudes *in vivo*

12.1.5.1 Modèle animal

Les expériences *in vivo* sont conduites sur trois rats Fischer mâles syngéniques, âgés de 7 à 8 semaines et pesant entre 220 et 240 g. Les tumeurs cérébrales sont inoculées selon le protocole décrit précédemment (section 9.3.1, p. 148) au premier jour de l’expérience (J0). Dix-neuf jours après l’implantation, les tumeurs se sont développées et atteignent un volume de plusieurs dizaines de mm^3 . Ce stade de développement relativement avancé (la survie moyenne des rats sans traitement est d’environ 23 jours) ne correspond pas au stade préconisé pour un traitement, mais est choisi ici pour faciliter les mesures des volumes en imagerie. A ce stade, les animaux reçoivent une injection locale de GdNPs (injection par CED dont le protocole a précédemment été décrit, cf. 6.5, p. 99). 5 μL de GdNPs, concentrés à 22 mg Gd/mL sont injectés aux mêmes coordonnées stéréotaxiques que celles définies pour l’implantation du gliome. Juste après l’injection des NPs, un cathéter est posé dans la veine de la queue du rat afin d’injecter 1.5 mL d’Ioméron® (350 mg/mL), suivi d’un bolus de 0.5 mL de NaCl. L’iode circule par voie sanguine. L’imagerie commence environ 10 minutes après cette dernière injection afin de laisser le temps à l’AC de diffuser et de d’atteindre la tumeur. De plus, l’injection d’un AC ne peut pas être réalisée directement sur le support dédié à l’imagerie, car l’animal y est installé en position verticale qui empêche l’accumulation d’un AC dans la tumeur cérébrale.

12.1.5.2 Mesure des concentrations d'éléments lourds

De la même manière que pour les images de fantôme, les images d'iode et de NPs sont générées par l'algorithme de séparation des éléments. Les ROI d'iode et de gadolinium sont définies sur le premier scan après l'injection des solutions d'iode et de gadolinium respectivement. Ces ROI sont conservées pour la mesure des concentrations moyennes d'iode et de gadolinium dans les scans acquis aux temps suivants. L'acquisition simultanée des images permet de totalement s'affranchir des problèmes complexes de recalage qui seraient incontournables si les volumes d'AC et de NPs avaient été acquis indépendamment.

12.1.5.3 Segmentation des volumes d'intérêt

Les volumes d'AC et de NPs sont segmentés et mesurés avec le logiciel Avizo (version 7.0). La présence de l'os entraîne l'apparition d'artéfacts en étoile (ou artéfacts d'épandage) lorsque les données sont reconstruites par la méthode de bi-énergie. Cela complique la segmentation des volumes d'AC et de NPs. Pour réduire ces problèmes, la boîte crânienne est d'abord isolée du reste de l'image grâce à une segmentation par seuillage. Ensuite, sur chaque jeu d'images (iode ou gadolinium), les distributions des éléments lourds sont segmentées par la même méthode. Les voxels sont inclus dans la région d'intérêt si la valeur de leur niveau de gris est supérieure à 10% de celle du voxel le plus intense dans le volume. Les distributions sont ensuite lissées et superposées pour mesurer le recouvrement des NPs par rapport au volume d'AC.

12.2 Caractérisation du volume tumoral

La distribution des NPs est comparée au volume tumoral mis en évidence par la distribution de l'AC dans le cerveau. Cette prise de contraste est bien connue pour se faire spécifiquement dans les régions où la BHE est lésée, c'est à dire au niveau des nouveaux vaisseaux créés en même temps que la tumeur se développe pour lui fournir les nutriments dont elle a besoin [Le D 00] [Adam 03]. Cependant, l'AC diffuse et se propage dans les tissus selon des critères moins bien connus et définis que la simple lésion de la BHE. Sa distribution suite à une injection par voie veineuse n'a, à notre connaissance, jamais été confrontée au volume réel de la tumeur mesuré à l'échelle du micromètre. Pour vérifier ce paramètre important, une série d'expériences a été conduite sur trois animaux porteurs d'un gliome implanté selon le protocole décrit plus haut (cf. 9.3.1 page 148). Dix-neuf jours après l'implantation des cellules tumorales, les rats sont à nouveau anesthésiés, puis reçoivent une injection d'iode intraveineuse (1.5 mL d'Ioméron® à 350 mg/mL). La cinétique d'accumulation et d'élimination de l'AC est ensuite imagée par SRCT (une énergie). Une fois l'AC totalement éliminé (au bout de quelques heures), les rats sont euthanasiés (injection intracardiaque de 0.2 mL de Doléthal®, sous anesthésie générale) et les cerveaux sont prélevés et fixés dans une solution de formaldéhyde 10%. Ensuite, les échantillons fixés sont imagés à très haute résolution par deux techniques d'imagerie différentes (interférométrie X par réseaux et IRM) qui permettent d'imager les volumes tumoraux réels à l'échelle micrométrique, grâce à une différence de contraste tissulaire entre zones tumorales et zones saines. La segmentation et la mesure des volumes tumoraux mis en évidence par les différentes techniques nous permet de connaître le temps pour lequel la distribution de l'AC représente le mieux la tumeur. Ces expériences nous permettent également de comparer deux méthodes d'imagerie haute résolution pour la caractérisation tissulaire des gliomes.

12.2.1 Imagerie des tumeurs *in vivo*

12.2.1.1 Set-up expérimental et paramètres d'acquisition

Pour ces expériences, les rats ont reçu une simple injection d'iode. Une tomographie à une énergie est suffisante pour en imager la distribution *in vivo*. Les rats ont été préparés de la même manière que pour les expériences d'imagerie à deux énergies. Le faisceau est issu du monochromateur de tomographie qui est décrit à la section 3.1.2, p. 47 et dont l'énergie a été réglée au dessus du K-edge de l'iode. Les paramètres d'acquisition sont regroupés dans le tableau 12.3. L'expérience s'étant déroulée sur deux temps expérimentaux distincts, quelques paramètres d'acquisition diffèrent entre le premier rat (A) et les deux suivants (B et C) (cf. Tab. 12.3). Dans tous les cas, le même détecteur a été utilisé. Il s'agit d'une caméra CCD à haute résolution spatiale ($44.7 \mu m$) afin de faciliter la comparaison des images avec celles obtenues plus tard *ex vivo*. De la même manière que pour la tomographie à deux énergies, les scans sont acquis toutes les 10 *min* environ sur une durée totale de 2h après injection de l'AC.

Animal	A	B	C
E (keV)	35	35	35
Nb projections	1000	2000	2000
Nb coupes	300	450	450
Dimensions de l'image (px)	1857 x 1857	951 x 951	951 x 951
Résolution horizontale (μm)	44.7	44.7	44.7
Résolution verticale (μm)	50.0	45.0	45.0

TABLE 12.3 – Paramètres d'acquisition pour les tomographies à une énergie, réalisées sur trois rats, A, B et C.

12.2.1.2 Reconstruction des images et segmentation du volume d'AC

Les images 3D sont reconstruites à partir de l'ensemble des projections, avec un algorithme de rétroprojection filtrée (software IDL-Tomo), développé spécifiquement pour cette application. Les volumes tumoraux mis en évidence par la prise de contraste iodé ont été segmentés à l'aide du logiciel Avizo (version 7.0). Ce logiciel dédié au traitement d'images, possède plusieurs outils pour la segmentation. La forte résolution de ces images ($44.7 \mu m$) ne permet pas de maximiser le contraste. Les images sont redistribuées sur une plage de niveaux de gris beaucoup plus petite et centrée sur les valeurs des pixels où apparaît l'iode. Ce ré-échantillonnage met davantage en évidence l'AC (cf. Fig. 12.6(c)). Le niveau de bruit ne permettant pas une méthode automatique, la segmentation du volume d'iode est réalisée par un contourage manuel de la région d'intérêt coupe à coupe. Cette méthode est plus longue que d'autres méthodes automatiques (par croissance de région ou par seuillage par exemple), mais permet de sélectionner le volume d'iode dans son intégralité comme le font les radiothérapeutes en clinique. La figure 12.6(c) donne un exemple de contourage sur une coupe centrale du gliome de l'animal B à un temps précoce après l'injection d'iode. Le volume d'iode total est extrait et mesuré pour chaque scan, suite à l'empilement des zones contourées et à un lissage coupe à coupe.

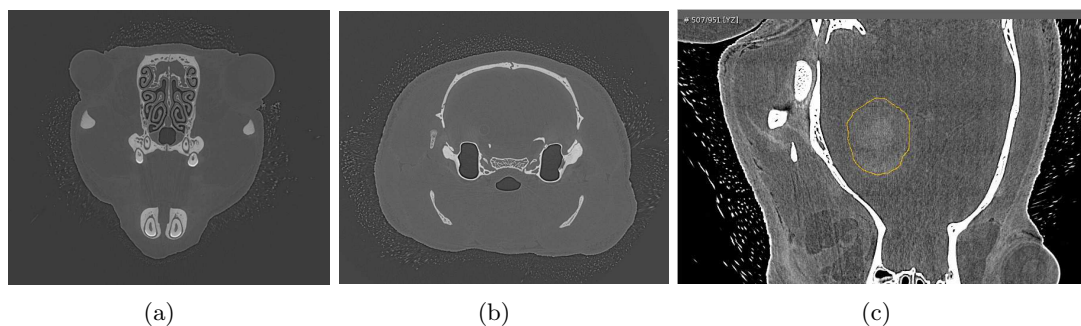


FIGURE 12.6 – (a) et (b) Coupes axiales à différentes positions dans le cerveau de l’animal B, sans ré-échantillonnage des niveaux de gris. (c) Contourage du volume d’iode sur une coupe frontale au centre du gliome, 40 *minutes* après l’injection. L’image est ré-échantillonnée sur une plage de niveaux de gris plus étroite pour faire apparaître l’iode (moins brillant que l’os).

12.2.2 Imagerie des tumeurs *post-mortem*

L’étude des tissus se fait classiquement par histologie, où des marqueurs spécifiques sont utilisés pour mettre en évidence différents composants (cellulaires ou subcellulaires) sur des coupes très fines de tissu. Cette technique nécessite un savoir-faire important et un traitement long des échantillons selon les éléments recherchés. Depuis quelques années, des techniques d’imagerie se développent dans le but de mettre en évidence des différences de contraste très fines dans les tissus mous. Ces techniques qui permettent d’imager la structure tissulaire en 3D, facilitent l’analyse volumique des échantillons et simplifient énormément leur préparation. Dans le cadre de l’étude des gliomes *ex vivo*, nous avons comparé deux de ces techniques : l’IRM anatomique haute résolution et la méthode de *grating interferometry*.

12.2.2.1 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Les cerveaux prélevés ont été imagés par résonance magnétique sur la plateforme IRM du GIN (Grenoble Institut des Neurosciences), en collaboration avec Vasile Stupar. L’imagerie par résonance magnétique est aujourd’hui très utilisée en clinique (et pré-clinique) et notamment pour l’imagerie cérébrale, puisqu’il s’agit d’une technique très sensible, non invasive et non irradiante, qui permet de mettre en évidence des structures qui ne sont pas visibles en tomodensitométrie (parfois même sans AC). Dans notre étude, nous avons utilisé l’IRM pour imager des tissus prélevés et fixés, ce qui ne correspond pas à sa première utilisation, mais qui, lorsqu’on travaille à très forte résolution, permet de caractériser les différences tissulaires fines dans un échantillon biologique.

L’imagerie est basée sur la mesure des propriétés magnétiques des protons, constituants majoritaires des tissus biologiques. Les protons possèdent un moment magnétique (ou spin) qui s’oriente dans la même direction que celle du champ magnétique statique \vec{B}_0 dans lequel ils sont plongés. L’aimantation \vec{M} créée n’est pas directement mesurable car elle est noyée dans le champ \vec{B}_0 , mais une impulsion radio-fréquence (\vec{B}_1) moins intense, appliquée dans un plan perpendiculaire à celui de \vec{B}_0 permet de créer une composante transversale de l’aimantation (\vec{M}_{xy}) qui sera elle, détectable lors de son retour à l’équilibre (cf. Fig. 12.7(a)).

Les volumes anatomiques sont reconstruits à partir des mesures de la relaxation de l'aimantation transversale des protons du milieu. Les caractéristiques temporels de cette relaxation dépendent de la densité de protons et donc de la nature des tissus. Les cerveaux ont été imagés par une séquence pondérée en T2 (temps de relaxation transverse, *i.e* temps au bout duquel l'aimantation \vec{M}_{xy} vaut 37% de sa valeur initiale - cf. Fig. 12.7(b)).

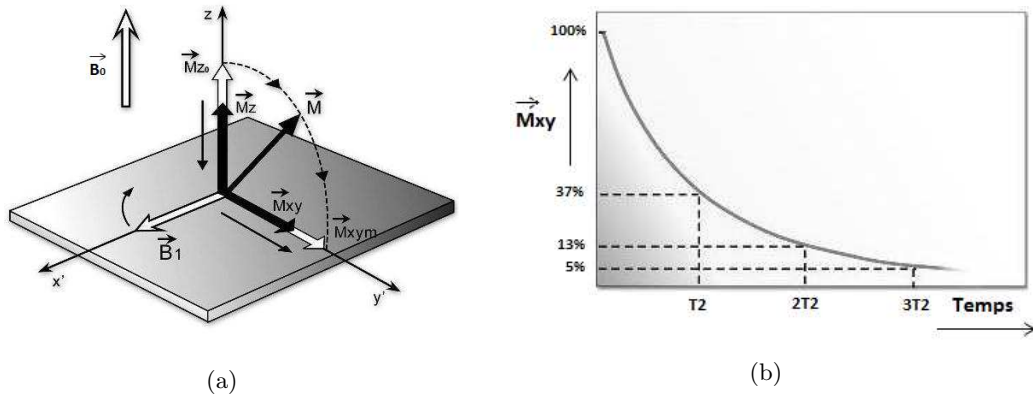


FIGURE 12.7 – (a) Décomposition de l'aimantation \vec{M} créée par \vec{B}_0 suite à la suite de l'application d'une impulsion radio-fréquence \vec{B}_1 perpendiculaire au champ magnétique \vec{B}_0 . (b) Décroissance de la composition transverse de l'aimantation \vec{M}_{xy} en fonction du temps après l'impulsion radio-fréquence.

Les paramètres d'acquisition ont été ajustés de manière à augmenter au maximum la résolution spatiale des images tout en conservant un bon contraste et dans un temps d'acquisition raisonnable. Les paramètres expérimentaux sont regroupés dans le tableau 12.4.

Paramètres	
Champ magnétique (T)	7
Antennes	Surface
TR (ms)	4000
TE (ms)	36.9
Nb de répétitions	55296
Nb coupes	96
Dimensions d'une coupe (px)	512 x 512
Résolution horizontale (μm)	39.1
Résolution verticale (μm)	200
Temps d'acquisition (h)	61

TABLE 12.4 – Paramètres d'acquisition pour l'imagerie des cerveaux A, B et C par IRM. TR correspond au temps de répétition, *i.e* au temps entre deux excitations successives. TE désigne le temps d'écho, *i.e* le temps entre l'excitation et l'acquisition du signal.

12.2.2.2 X-rays Grating Interferometry

A l'inverse des techniques d'imagerie par rayons X basées sur l'atténuation des particules dans l'objet, les techniques d'imagerie par contraste de phase utilisent des éléments optiques supplémentaires, ou exploitent les propriétés de propagation des ondes pour transformer le changement de phase provoqué par la présence d'un échantillon entre la source et le détecteur (cf. section 2.1, page 26) en une modulation d'intensité mesurable. Il existe aujourd'hui quatre principales techniques d'imagerie X par contraste de phase qui sont désignées par les méthodes d'interférométrie par cristal (*crystal interferometry*), d'imagerie par propagation (*propagation-based imaging*), d'imagerie par analyseur (*analyzer-based imaging*) et d'interférométrie par réseaux (*grating interferometry*). Nous ne détaillerons pas toutes ces méthodes ici, mais une très bonne description est fournie dans la thèse de *I. Zanette* avec qui nous avons collaboré pour cette série d'expériences [Zane 11].

L'imagerie des cerveaux porteurs d'un gliome F98 a été réalisée sur la ligne de lumière ID19 à l'ESRF, par la technique de *grating interferometry*. Cette technique est basée sur la détection des modifications de la phase des rayons X induites par la présence de l'échantillon entre la source et le détecteur. Pour détecter ces changements de phase, des éléments optiques spécifiques sont introduits dans le set-up expérimental (représenté schématiquement par la figure 12.8(a)).

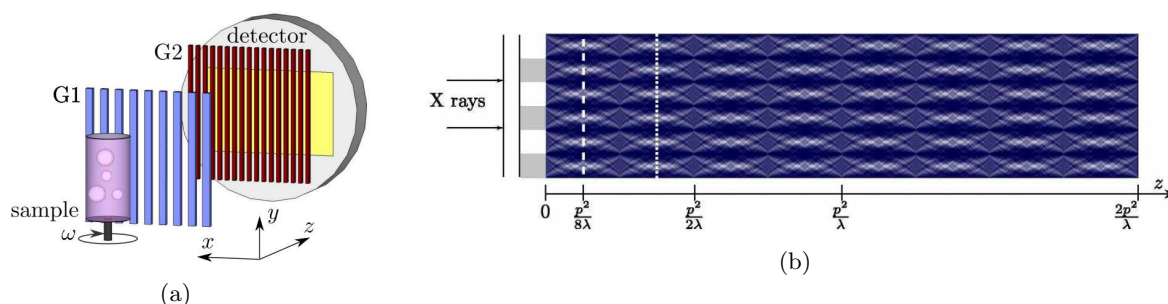


FIGURE 12.8 – (a) Représentation schématique du set-up expérimental mis en place pour la méthode de *grating interferometry* sur ID19. L'échantillon est placé en amont (par rapport au détecteur) de deux grilles G_1 et G_2 de périodes p_1 et p_2 respectivement, qui permettent de récupérer les informations de modulation de phase des ondes arrivant sur G_1 . Figure extraite de [Zane 11]. (b) Motifs d'interférences générés par une grille exposée à une source de rayons X monoénergétiques en fonction de la distance à la grille. Figure extraite de [Weit 06].

Une grille périodique de diffraction G_1 , de période p_1 est placée derrière l'échantillon. Exposée à une source d'ondes planes, la grille produit des images d'elle-même, répétées à différentes positions régulières à partir de sa position d'origine. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Talbot³. Il a premièrement été observé par H. Talbot en 1836, défini comme étant la conséquence de la diffraction de Fresnel par J. Rayleigh en 1881 et mis en évidence pour la première fois avec des rayons X par *Peter Cloetens* en 1997 [Cloe 97]. Un exemple de motifs d'interférences générés par une grille de diffraction périodique exposée à des rayons X monoénergétiques est illustré par la

3. Un objet périodique absorbant exposé à une source de rayonnement spatialement cohérente produit des images de lui même à différentes distances le long de l'axe optique.

figure 12.8(b). Les distances auxquelles se répètent les images sont régulières et appelées distances de Talbot (D_m). Elles se calculent par la formule suivante :

$$D_m = m \frac{2p^2}{\lambda} \quad (12.20)$$

avec $m = 1, 2, 3, \dots, p$ la période de la grille et λ , la longueur d'onde de l'onde. La période de la grille définit le décalage de phase du signal observé par rapport au signal original. Des grilles produisant un décalage de phase de π ou $\pi/2$ permettent d'obtenir des motifs d'interférences plus fortement contrastés et augmentent la sensibilité du système. Lorsqu'on introduit un échantillon entre la source et la grille de diffraction G_1 , les motifs d'interférences sont distordus par rapport à l'image de référence (sans échantillon). La technique de *grating interferometry* se base sur la comparaison de ces deux signaux (avec et sans échantillon) pour extraire des informations sur les propriétés d'atténuation, de réfraction et de diffusion de l'objet. Le motif d'interférences produit par G_1 ne peut pas être détecté directement (contraintes techniques trop importantes pour le faire : résolution du détecteur, distance de Talbot trop grande...). Une seconde grille absorbante G_2 , de période p_2 est donc placée juste devant le détecteur, à une distance de Talbot D_m de G_1 , pour analyser la position des franges et leurs amplitudes dans le plan d'observation.

Le signal est acquis pas à pas. Une série d'images est enregistrée pour différentes positions transverses de l'une des deux grilles et pour une distance minimale d'une période du motif d'interférences. L'acquisition sous différentes incidences lors de la rotation de l'échantillon permet ensuite de reconstruire les images en 3D. L'intensité enregistrée dans un pixel est égale à la convolution du motif d'interférences détecté sur ce pixel avec la fonction de transmission locale de la grille. Ce signal est sinusoïdal et trois images peuvent être extraites des différences mesurées entre le signal de référence (grille) et celui provoqué par l'échantillon : Une image d'atténuation, une image de réfraction et une image de diffusion. La figure 12.9(a) illustre les signaux de référence (bleu) et obtenu suite au scan d'une fourmi (rouge). Les figures 12.9(b), 12.9(c) et 12.9(d) représentent les images d'atténuation, de réfraction et de diffusion extraites de ces signaux.

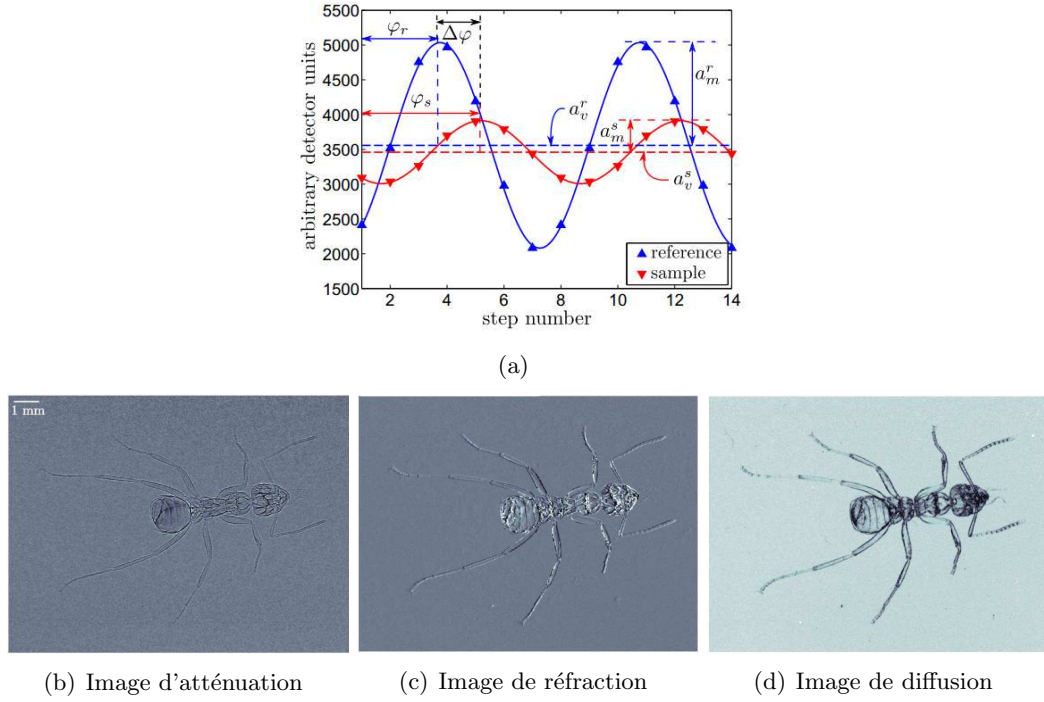


FIGURE 12.9 – (a) Signaux obtenus dans un pixel pour un scan de référence (bleu : grille seule) et suite au scan d'une fourmi (rouge). (b), (c) et (d) Images d'atténuation, de réfraction et de diffusion reconstruites à partir des signaux d'intensité. Figures extraites de [Zane 11].

L'image d'atténuation est reconstruite pixel à pixel depuis la mesure du rapport $(\frac{a_v^s}{a_v^r})$, défini sur la figure 12.9(a). L'image de réfraction est obtenue à partir de la mesure de $(\Delta\varphi)$ et l'image de diffusion, à partir de la quantité $(\frac{a_m^s}{a_v^s} \frac{a_v^r}{a_m^r})$ (cf. Fig. 12.9(a)).

Les cerveaux A, B et C fixés et préparés selon le protocole décrit plus haut sont imagés par la méthode de *grating interferometry*. Ils sont placés dans un contenant étanche rempli de formaldéhyde 10% et dont les dimensions sont ajustées à celle de l'organe pour assurer son immobilité pendant la tomographie. Les paramètres expérimentaux définis pour l'acquisition des images sont regroupés dans le tableau 12.5 suivant. La dose déposée par scan est difficile à estimer précisément mais l'ordre de grandeur correspond à plusieurs centaines de Gy .

12.2.2.3 Segmentation des tumeurs imagées *ex vivo*

Les tumeurs imagées *ex vivo* (que ce soit par IRM ou *grating interferometry*) sont extraites des images par une méthode de segmentation basée sur la croissance de région. Le contraste entre les différents tissus est suffisamment important pour que cette méthode soit utilisable. Le logiciel VG Studio Max (version 2.1) a été utilisé pour cette étude. La méthode consiste à définir une première zone appartenant à la région d'intérêt. L'algorithme permet ensuite d'élargir cette zone en incluant les voxels voisins qui ont une valeur de niveau de gris proche de celle des voxels de référence. Le

Animal	A	B	C
	Hémisphère droit	Cerveau entier	Cerveau entier
E (keV)	19	19	19
G_1 (composition, période (μm))	Si, 4.79	Si, 4.79	Si, 4.79
G_2 (composition, période (μm)- G_1 (mm)	115	120	120
Distance G2-Det. (mm)	105	~ 50	~ 50
Nb projections	800	700	500
Nb coupes	1024	1716	1716
Dimensions de l'image (px)	2048x2048	1200x1200	1200x1200
Résolution horizontale (μm)	7.5	14.74	14.74
Temps d'acquisition (h)	5	~ 10	~ 10

TABLE 12.5 – Paramètres d'acquisition pour l'imagerie des cerveaux A, B et C par la méthode de *grating interferometry*. De la même manière que pour l'imagerie *in vivo*, les trois échantillons ont été imagés sur des temps de faisceaux différents, conduisant à la variation de quelques paramètres expérimentaux.

critère "proche" est défini selon un seuil choisi par l'utilisateur. La figure 12.10 donne un exemple de segmentation des volumes tumoraux (vue en coupes) par cette technique et pour chacune des méthodes d'imagerie utilisées. Les volumes sont mesurés puis comparés aux volumes d'iode imagés *in vivo*. Les modalités d'imagerie étant très différentes pour chaque méthode (absence de repères fixes communs aux images *in vivo* et *post-mortem*, différence de taille de voxels, nombre de coupes différent, etc), nous n'avons pas recalé les images acquises par les différentes modalités, entre elles. Les volumes d'iode sont comparés aux volumes tumoraux réels sur un critère de taille uniquement.

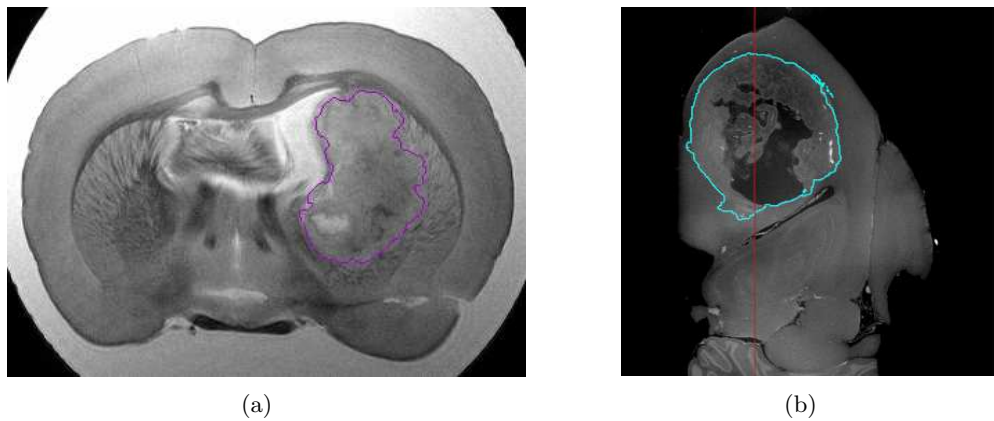


FIGURE 12.10 – Segmentation du volume tumoral par la méthode de croissance de région (a) sur une coupe axiale imagée par IRM et (b) sur une coupe sagittale imagée par *grating interferometry*.

Chapitre 13

Caractérisation de la distribution des nanoparticules dans un gliome

Sommaire

13.1 Tomographie à deux énergies : optimisation	208
13.1.1 Énergies optimales	208
13.1.2 Mesures sur fantômes	209
13.2 Application à l'imagerie d'un AC et de NPs chez le petit animal	213
13.2.1 Simulations	213
13.2.2 Imagerie <i>in vivo</i>	214
13.3 Comparaison de la prise de contraste au volume tumoral réel	217
13.3.1 Prise de contraste iodé	218
13.3.2 Imagerie des tumeurs <i>ex vivo</i>	219
13.3.3 Comparaison des différentes modalités d'imagerie	225
13.4 Conclusion	226

La première partie de ce chapitre décrit la caractérisation de la méthode de tomographie à deux énergies mise en place sur ID17. Simulations et mesures sur fantômes seront comparées afin d'établir les limites de sensibilité de la technique. Puis, les résultats *in vivo* concernant l'imagerie simultanée de la tumeur (mise en évidence par prise de contraste iodé) et des GdNPs (injectées par CED dans la tumeur) seront présentés dans un deuxième temps.

Dans cette étude, la distribution de l'AC (là où la BHE est rompue) est considérée comme représentant la tumeur. Afin de vérifier cette hypothèse, une dernière partie sera consacrée à la comparaison du gliome F98 imagé *ex vivo* avec sa prise de contraste iodé imagée *in vivo*. La caractérisation tissulaire de la tumeur s'appuiera sur trois modalités d'imagerie à haute résolution différentes : la tomographie *X* par contraste de phase, l'imagerie par résonance magnétique et l'histologie.

13.1 Tomographie à deux énergies : optimisation

La caractérisation de la méthode de tomographie à deux énergies a été principalement effectuée par *Fanny Marticke*, lors de son stage de fin d'études réalisé au laboratoire pendant la première année de cette thèse. Des simulations ont permis d'évaluer les paramètres d'acquisition optimum (couple d'énergies en fonction des éléments imagés, de la taille de l'échantillon et de la dose déposée par scan). Des mesures expérimentales sur fantômes ont ensuite été réalisées pour vérifier l'aspect quantitatif de la méthode d'imagerie développée. Nous consacrerons cette première partie aux principaux résultats de caractérisation, avant de présenter les résultats liés à l'application *in vivo*.

13.1.1 Énergies optimales

Le choix des énergies utilisées pour la tomographie à deux énergie est en grande partie responsable de la qualité des images et de la sensibilité de détection. Les fonctions Figure Of Merit (*FOM*) et Minimum Detectable Concentration (*MDC*) ont été calculées sur la gamme énergétique disponible sur ID17 (30 - 85 *keV*) selon la méthode décrite précédemment (cf. paragraphe 12.1.3, page 191). Le tableau 13.1 regroupe les différentes valeurs pour trois couples d'énergies particuliers. Le couple d'énergies optimales pour la détection de l'iode et du gadolinium est 33.2 *keV* et 50.3 *keV*, avec une *FOM* de 3.07 *mGy*^{-1/2}. Ce résultat s'explique par le fait qu'il s'agit des énergies supérieures au K-edge de l'iode et du gadolinium respectivement. Ces énergies permettent de maximiser les différences d'atténuation des photons entre les deux images et améliore donc la qualité de la séparation des éléments. Pour ce couple énergétique, les *MDC* de l'iode et du gadolinium valent respectivement 0.18 et 0.34 *mg/mL*.

Couple d'énergies	Optimum	Expérimental	K-edge Gd
E_1 (<i>keV</i>)	33.20	33.02	50.09
E_2 (<i>keV</i>)	50.30	33.32	50.39
Dose totale (<i>Gy</i>)	0.064	0.096	0.032
<i>FOM</i> (<i>mGy</i> ^{-1/2})	3.07	2.18	1.95
<i>MDC_I</i> (<i>mg/mL</i>)	0.18	0.19	0.51
<i>MDC_{Gd}</i> (<i>mg/mL</i>)	0.34	0.45	0.47

TABLE 13.1 – Valeurs de *FOM* et de *MDC* pour la détection d'un mélange d'iode et de gadolinium dans l'eau en fonction du couple d'énergies choisi. Le couple "optimum" correspond à la plus grande valeur de *FOM*. Le couple "expérimental" correspond à celui choisi pour les expériences (de part et d'autre du K-edge de l'iode). Le couple "K-edge Gd" correspond aux énergies encadrant le K-edge du Gadolinium. La dose totale déposée à la surface de l'objet est estimée à partir des équations 12.2 et 12.4, p. 191.

Le monochromateur utilisé sur ID17 pour la production des deux faisceaux ne permet pas d'obtenir des énergies très éloignées (contrainte liée à la géométrie du cristal et du set-up). En pratique, les énergies E_1 et E_2 peuvent être séparées de 300 *eV*. Afin de conserver l'avantage du K-edge pour au moins l'un des deux éléments, il est judicieux d'encadrer le K-edge de l'iode (33.17 *keV*), ou celui du gadolinium (50.25 *keV*). Le K-edge de l'iode apparaît le plus intéressant puisque les

concentrations attendues *in vivo* pour cet élément (injecté par voie veineuse) sont plus faibles que celles attendues pour le gadolinium (injecté localement). D'autre part, la FOM est plus grande que pour les énergies encadrant le K-edge du gadolinium (2.18 contre $1.95 \text{ mGy}^{-1/2}$) et les limites de détection des concentrations sont plus faibles (cf. Tab. 13.1).

La MDC ne dépend pas uniquement du couple d'énergies utilisé, mais aussi de l'échantillon et des paramètres d'imagerie. Elle a été mesurée dans le cas d'une acquisition avec le couple d'énergies encadrant le K-edge de l'iode (33.02 et 33.32 keV), en fonction de la taille de l'échantillon l (de 3 à 23 cm , dimensions qui correspondent à un crâne de rongeur et d'homme respectivement) et en fonction de la dose D déposée à la surface de l'échantillon par scan (cf. Fig. 13.1.1).

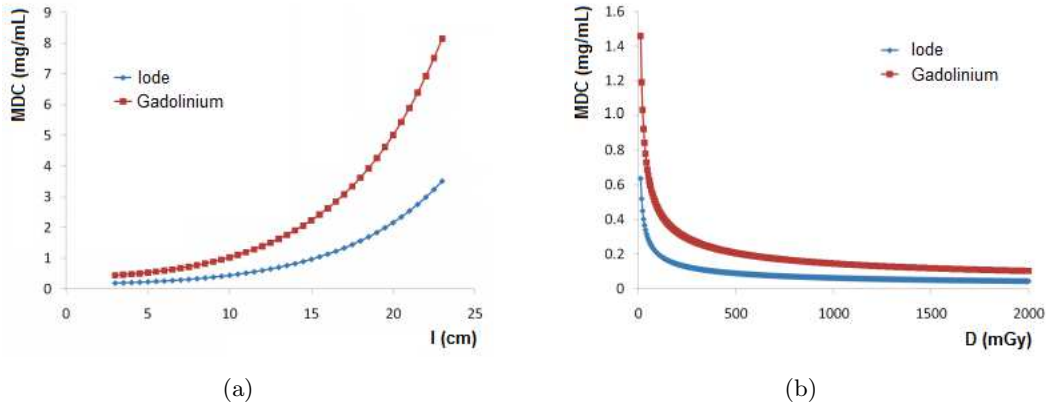


FIGURE 13.1 – (a) Dépendance de la MDC à la taille l de l'échantillon (pour $D_{tot} = 96 \text{ mGy}$) et (b) à la dose déposée par scan en surface de l'échantillon (pour $l = 3 \text{ cm}$). Les concentrations d'iode sont en bleu et celles du gadolinium, en rouge. Les énergies utilisées sont 33.02 et 33.32 keV , la hauteur du faisceau vaut 0.3 cm , un scan comprend 720 projections et la taille des pixels vaut 0.035 cm .

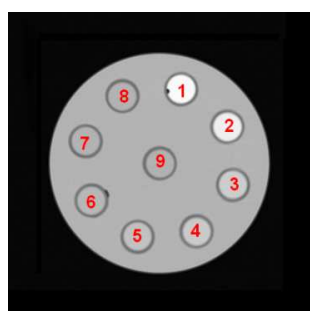
La MDC augmente avec la taille de l'échantillon mais diminue avec la dose puisque la statistique de comptage augmente avec celle-ci. Dans un échantillon de 3 cm , les plus petites concentrations d'iode et de gadolinium mesurables avec une dose d'environ 100 mGy valent théoriquement 0.19 et 0.45 mg/mL , ce qui permet d'envisager des applications *in vivo* intéressantes bien que l'hétérogénéité des structures et des distributions des éléments complique le problème. De manière générale, les limites de détections sont meilleures pour l'iode que pour le gadolinium, ce qui est principalement dû au choix des énergies (de part et d'autre du K-edge de l'iode).

13.1.2 Mesures sur fantômes

13.1.2.1 Description qualitative des images

Le set-up expérimental implémenté sur la ligne de lumière ID17 (décrit au paragraphe 12.1.1, p. 188) a été dans un premier temps testé pour l'imagerie simultanée de deux AC mélangés de

manière homogène à différentes concentrations et placés à l'intérieur d'inserts cylindriques dans un fantôme de plexiglass (cf. paragraphe 12.1.4.2, page 196). Les images simulées et expérimentales du fantôme décrit par la figure 13.2 ont été acquises aux deux énergies (33.02 et 33.32 keV) et ont été données à l'algorithme de séparation des éléments afin de générer une cartographie de la distribution de l'iode d'une part, et du gadolinium, d'autre part. Les images générées pour chaque jeu de données sont présentées sur la figure 13.3.

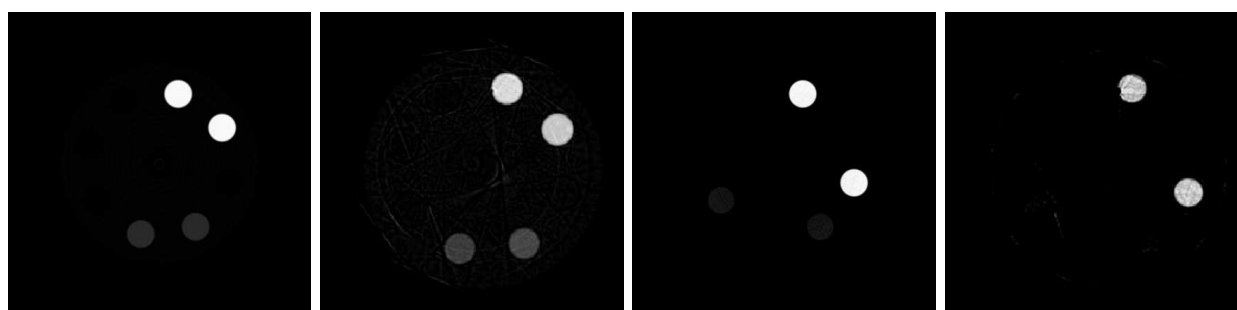


(a) Fantôme expérimental

Tube	[I] (mg/mL)	[Gd] (mg/mL)
1	3	3
2	3	0
3	0	3
4	0.5	0.5
5	0.5	0
6	0	0.5

(b) Concentrations d'I et Gd dans les tubes

FIGURE 13.2 – (a) Schéma du fantôme cylindrique constitué de plexiglass et comportant 9 tubes de 1.5 cm de diamètre. Les concentrations d'iode et de gadolinium contenues dans chaque tube sont données dans le tableau (b). Les tubes 7, 8 et 9 ne contiennent que de l'eau.



(a) Iode, simu.

(b) Iode, exp.

(c) Gd, simu.

(d) Gd, exp.

FIGURE 13.3 – Images générées par l'algorithme de séparation des éléments à partir des données simulées : (a) image d'iode et (c) image de gadolinium, et à partir des images expérimentales : (b) image d'iode et (d) image de gadolinium. Dans les deux cas, les images initiales sont acquises (ou simulées) pour des faisceaux d'énergies 33.02 et 33.32 keV .

Les images d'iode (cf. Fig. 13.3(a) & 13.3(b)) correspondent à celles attendues. Les tubes 1 et 2 (contenant 3 mg I/ mL) apparaissent brillants tandis que les tubes 4 et 5 (contenant 0.5 mg I/ mL) affichent une plus faible intensité. Les tubes 1 et 3 sont également bien mis en évidence dans les images de gadolinium (3 mg Gd/ mL), mais les tubes contenant les solutions moins concentrées (0.5 mg Gd/ mL) n'apparaissent pas (cf. Fig. 13.3(c) & 13.3(d)). Cela est en bonne adéquation avec les limites de détection (MDC) que l'on a précédemment évaluée à 0.45 mg/mL pour le gadolinium

et 0.19 mg/mL pour l'iode, pour ce couple d'énergies.

Les faibles concentrations peuvent cependant apparaître lorsqu'on force le contraste dans les images, bien que cela fasse également apparaître des artéfacts dans les données expérimentales (cf. Fig. 13.4). Les images ré-échantillonnées permettent de mettre en évidence plusieurs choses :

- Pour le couple d'énergies expérimental (33.02 et 33.32 keV), les distributions des AC à la concentration de 3 mg/mL sont mises en évidence avec précision et une bonne exactitude (écart-relatifs inférieurs à 5% pour l'iode et de l'ordre de 20% pour le gadolinium).
- Une concentration de 0.5 mg/mL d'iode peut également être détectée, mais une même concentration de gadolinium ne le sera pas.
- Des artéfacts "en ligne" apparaissent dans les images d'iode et de gadolinium générées à partir des images expérimentales. Ces artéfacts n'existent pas dans les données simulées, ce qui indique que le modèle simulé n'est pas tout à fait complet.

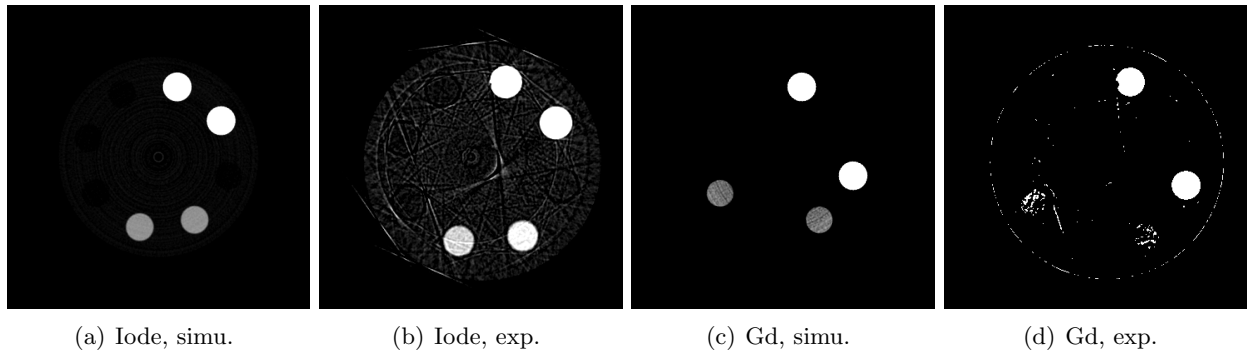


FIGURE 13.4 – Images générées par l'algorithme de séparation des éléments à partir des données simulées : (a) image d'iode et (c) image de gadolinium, et à partir des images expérimentales : (b) image d'iode et (d) image de gadolinium. Dans les deux cas, les images initiales sont acquises (ou simulées) pour des faisceaux d'énergies 33.02 et 33.32 keV . Le contraste est ré-haussé par rapport aux images de la figure 13.3.

13.1.2.2 Mesures des concentrations des AC

Les mesures expérimentales des concentrations d'iode et de gadolinium ont été comparées aux simulations (fantôme identique). Les tableaux 13.2 et 13.3 regroupent les valeurs théoriques, simulées et mesurées expérimentalement pour l'iode et le gadolinium respectivement.

La mesure des concentrations d'iode et de gadolinium dans les images simulées est en bon accord avec les prédictions établies par les mesures de *FOM* et de *MDC* : lorsque les énergies choisies encadrent le K-edge de l'iode (33.02 et 33.32 keV), les concentrations d'iode sont mesurées avec une bonne exactitude (écart relatif inférieur à 5%) jusqu'à des faibles concentrations (0.5 mg/mL). Les concentrations de gadolinium sont par contre sous-estimées et d'autant plus que la concentration est faible (l'écart relatif dépasse 50% pour une concentration de 0.5 mg/mL). Cette sous-estimation est due à la très faible différence d'atténuation des photons entre les deux images.

Iode		Simu. 33.02 & 33.32 keV		Simu. 33.2 & 50.3 keV		Exp. 33.02 & 33.32 keV	
Tube	$[I]_{th}$ (mg/mL)	$[I]_{simu}$ (mg/mL)	ER (simu/th)	$[I]_{simu}$ (mg/mL)	ER (simu/th)	$[I]_{mes}$ (mg/mL)	ER (mes/th)
1	3.0	2.9±0.1	4%	2.8±0.1	7%	3.2±0.1	5%
2	3.0	2.9±0.1	4%	2.8±0.1	7%	3.0±0.1	0%
3	0.0	0.0±0.0	-	0.0±0.0	-	0.03±0.05	-
4	0.5	0.5±0.1	3%	0.4±0.1	20%	0.7±0.1	35%
5	0.5	0.5±0.1	3%	0.4±0.1	20%	0.6±0.1	11%
6	0.0	0.0±0.0	-	0.0±0.0	-	0.03±0.05	-

TABLE 13.2 – Concentrations d’iode contenues dans chaque tube (1.37 cm de diamètre) du fantôme de plexiglas (10 cm de diamètre), théoriques, simulées et mesurées par la méthode de tomographie à deux énergies. L’erreur relative entre les valeurs simulées (ou mesurées) et théoriques est indiquée. La dose totale déposée à la surface de l’objet vaut 0.48 Gy lorsque les deux scans sont réalisés à basse énergie (autour de 33 keV) et 0.32 Gy pour le couple d’énergies optimal.

Gadolinium		Simu. 33.02 & 33.32 keV		Simu. 33.2 & 50.3 keV		Exp. 33.02 & 33.32 keV	
Tube	$[Gd]_{th}$ (mg/mL)	$[Gd]_{simu}$ (mg/mL)	ER (simu/th)	$[Gd]_{simu}$ (mg/mL)	ER (simu/th)	$[Gd]_{mes}$ (mg/mL)	ER (mes/th)
1	3.0	2.7±0.1	11%	2.9±0.0	1%	2.4±0.3	20%
2	0.0	0.0±0.0	-	0.0±0.0	-	0.0±0.0	-
3	3.0	2.7±0.1	11%	2.9±0.1	3%	2.4±0.2	20%
4	0.5	0.2±0.1	56%	0.5±0.1	2%	0.01±0.10	95%
5	0.0	0.0±0.0	-	0.0±0.0	-	0.0±0.0	-
6	0.5	0.2±0.1	57%	0.5±0.1	3%	0.01±0.10	95%

TABLE 13.3 – Concentrations de gadolinium contenues dans chaque tube (1.37 cm de diamètre) du fantôme de plexiglas (10 cm de diamètre), théoriques, simulées et mesurées par la méthode de tomographie à deux énergies. L’erreur relative (ER) entre les valeurs simulées (ou mesurées) et théoriques est indiquée. La dose totale déposée à la surface de l’objet vaut 0.48 Gy lorsque les deux scans sont réalisés à basse énergie (autour de 33 keV) et 0.32 Gy pour le couple d’énergies optimal.

Lorsque les énergies choisies correspondent aux énergies optimales (33.20 et 50.30 keV), la détection du gadolinium est beaucoup plus exacte. La concentration est mesurée avec un écart-relatif inférieur à 5% jusqu’à des concentrations aussi petites que 0.5 mg/mL. A l’inverse, la détermination des concentrations d’iode est moins bonne avec une erreur relative d’environ 20% pour une concentration de 0.5 mg/mL dans l’objet.

Les mesures réalisées sur les images réelles du fantôme, évoluent de la même manière que les simulations, avec une précision équivalente (de l’ordre de 0.1 mg/mL, cf. Tab. 13.2 et 13.3). L’exactitude des mesures est cependant moins bonne. Les fortes concentrations d’iode (3 mg/mL) sont évaluées avec une erreur relative inférieure à 5%, ce qui est encourageant pour une application médicale. Les concentrations de gadolinium sont par contre sous-estimées avec un écart relatif plus important, de l’ordre de 20%. Cette différence s’explique principalement par le choix des énergies qui n’est pas optimal pour cet élément, la différence d’absorption du gadolinium entre 33.02 et 33.32

keV étant petite. La détection des plus faibles concentrations (0.5 mg/mL) est encore moins exacte. L'erreur relative sur les concentrations d'iode augmente jusqu'à 35% et celle sur le gadolinium s'approche de 100%, car le signal est très faible, comme si l'élément n'était pas présent dans le mélange.

13.2 Application à l'imagerie d'un AC et de NPs chez le petit animal

13.2.1 Simulations

Le modèle animal est beaucoup plus complexe que le fantôme, où nous ne considérons jusqu'à présent que trois éléments (eau, iode et gadolinium) distribués selon une géométrie très simple (cylindres). Dans le cas de l'animal, le troisième élément n'est pas homogène puisque la nature des tissus varie fortement (tissus mous, peau, graisse, os, *etc*). L'utilisation de deux énergies ne permet pas de distinguer plus de trois éléments. La tête d'un rat a été simulée de manière simplifiée afin d'évaluer l'influence de ces hétérogénéités. Le rat est porteur d'un gliome et reçoit une injection intraveineuse d'iode ainsi qu'une injection directe de gadolinium (la géométrie complète du fantôme est décrite par la figure 13.5(a)). Les images de ce fantôme, simulées aux énergies encadrant le K-edge de l'iode (33.02 et 33.32 keV), sont présentées sur les figures 13.5(b) et 13.5(c). La dose par scan délivrée à la surface de l'objet a été fixée à 15 mGy . Les images des tissus, de l'iode et du gadolinium, générées par l'algorithme de séparation des éléments sont présentées sur la figure 13.6.

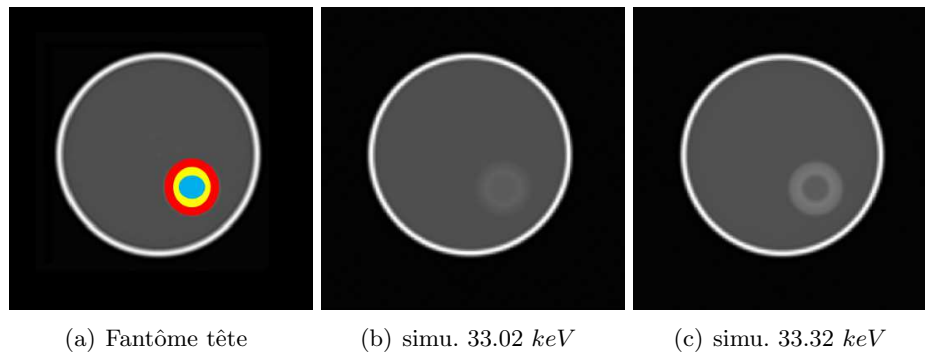


FIGURE 13.5 – (a) Représentation schématique de la tête d'un rat porteur d'un gliome. L'iode est représenté en rouge, le gadolinium en bleu et le mélange iode/gadolinium en jaune. L'os apparaît en blanc et le tissus en gris. (b) Image simulée de la tête du rongeur à 33.02 keV et (c) à 33.32 keV , pour une dose délivrée à la surface de 15 mGy/scan .

Les tissus, l'iode et le gadolinium ont été correctement séparés dans les images. Le crâne apparaît uniquement dans l'image du gadolinium, indiquant que la différence d'absorption des RX par l'os entre les deux énergies considérées, est proche de la différence d'absorption du gadolinium (à 3 mg/mL), tandis que celle de l'iode est bien différente (due à la transition brutale d'absorption des RX au niveau du K-edge). On observe cependant qu'un simple ré-haussement du contraste dans l'image permet de visualiser le gadolinium 13.6(d).

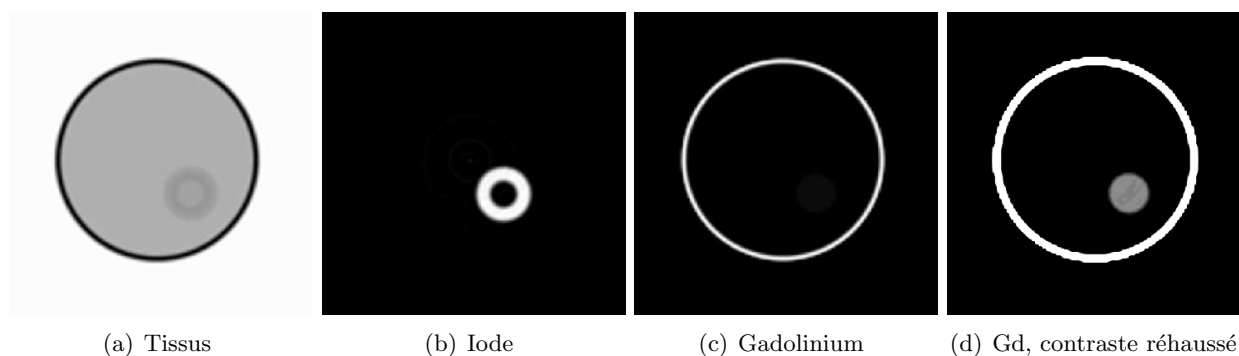


FIGURE 13.6 – Images de l’eau (a), de l’iode (b) et du gadolinium (c) générées par l’algorithme de séparation des éléments. (d) Image du gadolinium pour laquelle le contraste a été augmenté.

D’un point de vue quantitatif, les concentrations des deux éléments sont précisément mesurées et avec un écart relatif de 4% pour l’iode et de 7% pour le gadolinium. Du fait des énergies choisies, la concentration d’iode est plus exacte que celle du gadolinium. La dose totale délivrée pour l’examen ne dépasse pas 30 *mGy*, ce qui conforte l’intérêt de la technique pour l’imagerie *in vivo*.

13.2.2 Imagerie *in vivo*

Trois rats porteurs d’un gliome F98 ont reçu, 19 jours après l’implantation des cellules tumorales, une injection intraveineuse d’iode sous forme d’AC (1.5 *mL* à 350 *mg/mL*) et une injection de nanoparticules de gadolinium par CED (5 μL à 22 *mg/mL*). La tête des animaux a ensuite été imagée par la méthode de tomographie à deux énergies, avec des faisceaux d’énergie moyenne 33.02 et 33.32 *keV*. Plusieurs scans ont été répétés sur une période de 2h pour étudier l’élimination des éléments lourds au cours du temps. Les détails du protocole expérimental sont donnés au chapitre précédent (cf. 12.1.5.1, p. 197). Les images acquises en dessous et au dessus du K-edge de l’iode, ainsi que les images d’iode et de gadolinium sont présentées sur la figure 13.7.

La méthode d’imagerie met bien en évidence les distributions d’iode et de gadolinium dans le cerveau de l’animal, avec un différentiel bien net entre les zones où la BHE est lésée et le reste du cerveau. Les éléments semblent correctement séparés au niveau de la tumeur, bien que l’hétérogénéité des tissus entraîne l’apparition d’artéfacts. Sur les images d’iode, l’os n’apparaît pas, mais on observe l’iode en dehors de la tumeur, dans les régions les plus vascularisées de la tête (au niveau de la peau notamment). A l’inverse et comme mis en évidence par les simulations, l’os est présent dans les images de gadolinium. L’injection de GdNPs étant intra-crânienne, cela n’est pas un problème pour repérer et segmenter les volumes, mais cela pourrait l’être pour d’autres localisations. L’homogénéité des tissus cérébraux est un réel avantage pour l’application présentée ici. Cela permet de correctement séparer les distributions d’éléments lourds au niveau de la tumeur en s’affranchissant des problèmes liés à l’hétérogénéité des tissus. Les volumes d’iode et de GdNPs sont facilement segmentés par une méthode de seuillage et la figure 13.8 présente les résultats pour le premier scan chez l’animal E.

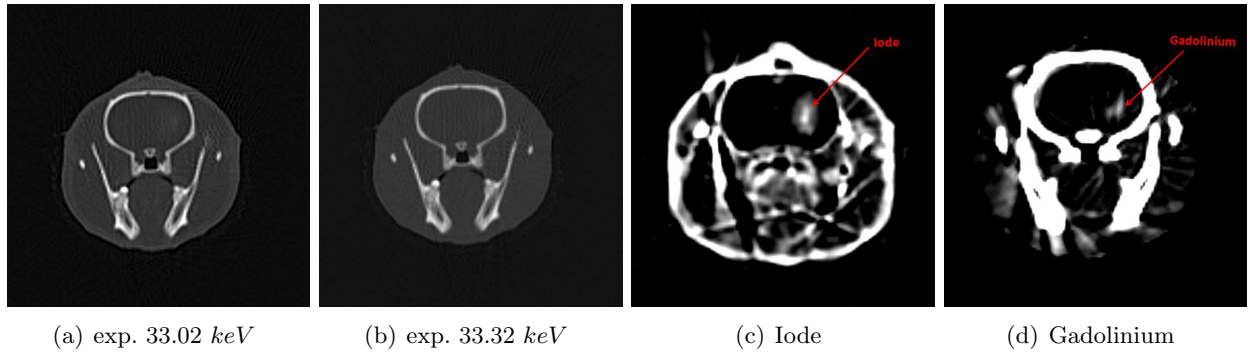


FIGURE 13.7 – Images de l'animal E acquises à 33.02 (a) et 33.32 keV (b). Image de l'iode (c) et image du gadolinium (d) générées par l'algorithme de séparation des éléments.

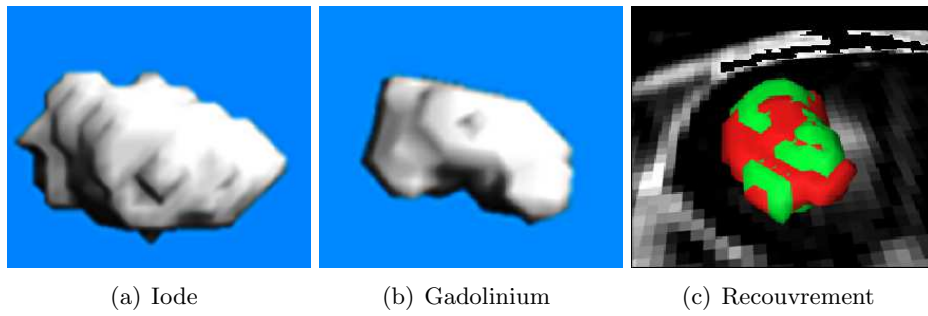


FIGURE 13.8 – Volumes d'iode (a) et de gadolinium (b) extraits du premier scan (10 minutes après injection) chez l'animal E. (c) Recouvrement des volumes l'un par rapport à l'autre (l'iode apparaît en rouge et les NPs en vert).

Quelque soit l'animal, le volume d'iode est plus important que celui des nanoparticules de gadolinium. Cela s'explique par le fait que la tumeur est déjà grosse au moment de la tomographie (19 jours après l'implantation des cellules tumorales), tandis que le volume de nanoparticules injecté ne vaut que $5 \mu L$. Ce volume de nanoparticules a été choisi à partir des résultats d'une étude de toxicité et dans l'optique d'une utilisation thérapeutique, à un stade beaucoup moins avancé du développement tumoral. Il n'est donc bien sûr pas adapté au volume tumoral considéré ici et l'étude présente des résultats préliminaires à l'optimisation des paramètres d'injections des NPs par CED.

Par ailleurs, les distributions d'AC et de NPs peuvent être décrites de manière quantitative. Dans le cas de l'AC, une zone plus concentrée est visible au centre, puis l'iode diffuse vers la périphérie de la tumeur jusqu'à disparaître. La figure 13.9 illustre l'hétérogénéité des valeurs de concentrations à l'intérieur des volumes segmentés, pour le scan le plus précoce. Les tendances sont semblables chez les trois animaux. L'iode s'accumule à une concentration moyenne d'environ 1 mg/mL tandis que le gadolinium est plus concentré (entre 2.6 et 3.8 mg/mL). La dispersion des mesures (σ) est cependant beaucoup plus importante dans le cas des NPs, illustrant la forte

hétérogénéité de leur distribution dans la tumeur. Les valeurs des concentrations moyennes et des écart-types associés sont données sur la figure 13.9.

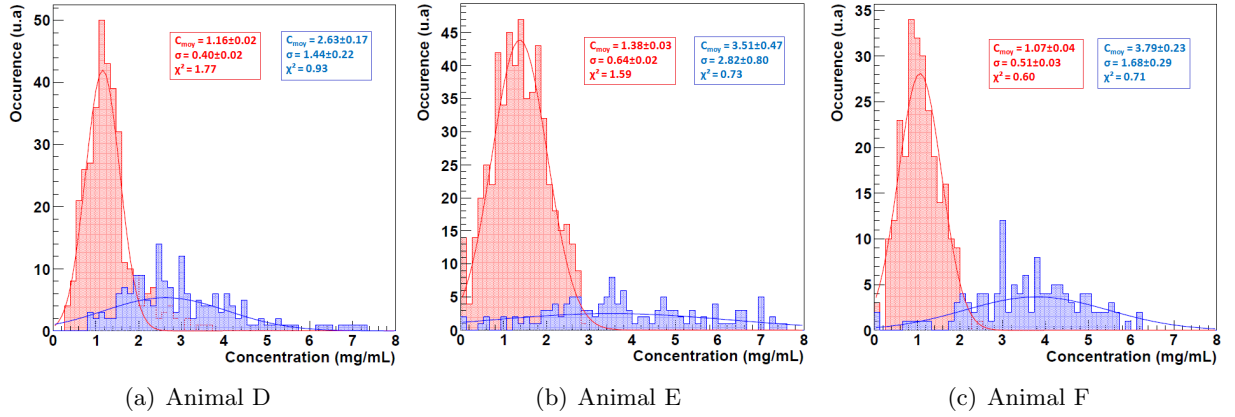


FIGURE 13.9 – Distribution des concentrations d'iode (rouge) et de gadolinium (bleu) mesurées chez chaque animal, à partir du premier scan après injection des solutions. (a) animal D, (b) animal E et (c) animal F.

Les NPs de gadolinium sont injectées à la concentration initiale de 22 mg/mL et n'ont probablement pas eu le temps d'être internalisées par les cellules au moment de l'imagerie (le scan est réalisé environ 10 minutes après l'injection). Les concentrations moyennes mesurées représentent donc le "facteur de dilution" avec lequel elles se distribuent dans les tissus. Ce facteur 6 (approximativement), s'explique en partie par le fait que les NPs diffusent tout d'abord dans le liquide interstitiel (qui remplit l'espace entre les capillaires sanguins et les cellules) et qui ne représente qu'un faible pourcentage du volume cérébral total ($\approx 20\%$).

Les cinétiques d'élimination de l'AC et des NPs ont été mesurées à partir de l'ensemble des scans (pendant 2h après les injections). Elles sont illustrées par la figure 13.10.

Animal	α_I	α_{Gd}	τ_I	τ_{Gd}
	(mg/mL)	(mg/mL)	(min) Décroissance [I]	(min) Décroissance [Gd]
D	1.85 ± 0.53	3.41 ± 0.53	76.5 ± 12.2	208.5 ± 22.8
E	1.50 ± 0.40	3.84 ± 0.91	98.3 ± 10.1	312.5 ± 31.0
F	1.30 ± 0.30	3.64 ± 0.81	81.1 ± 11.8	266.3 ± 42.4

TABLE 13.4 – Paramètres des ajustements des concentrations d'iode et de gadolinium représentées en fonction du temps, par la fonction $\alpha \cdot \exp(-t/\tau)$.

L'AC s'élimine beaucoup plus rapidement que les NPs, avec une constante de décroissance de

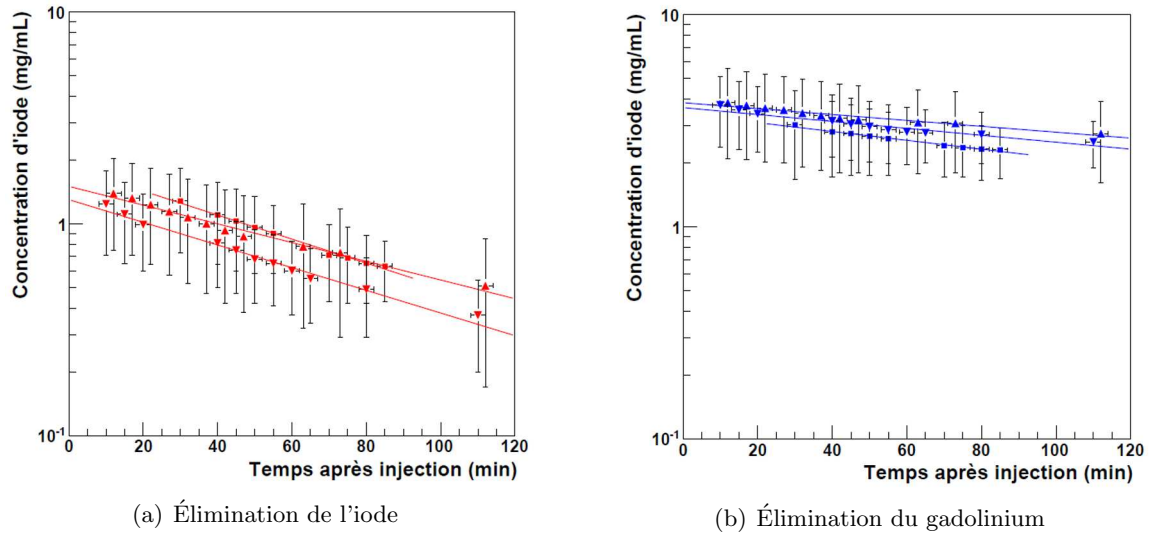


FIGURE 13.10 – Cinétique d'élimination de l'AC (a) et des NPs de gadolinium (b) pour les trois animaux : D (■), E (▲) et F (▼). Les données sont ajustées par la fonction $\alpha \cdot \exp(-t/\tau)$. Les paramètres α et τ sont regroupés dans le tableau 13.4.

l'ordre de 80 *min* contre 250 *min* pour les NPs (cf. Tab. 13.4). L'injection par voie directe favorise cette accumulation puisque les NPs ne sont pas directement dans la circulation sanguine, mais au contact des cellules qui pourront plus facilement les internaliser. Dans les deux cas, un système mono-compartmental ($\exp(-t/\tau)$) donne un bon ajustement, ce qui indique qu'il existe une voie principale d'élimination de l'AC et des GdNPs. Du fait de la petite taille des deux agents, une reprise par les capillaires sanguins semble très probable.

Le recouvrement du volume tumoral (défini comme étant le volume d'iode 10 minutes après injection) par les NPs est voisin de 50% aux temps précoces pour ce protocole d'injection (cf. Fig 13.11). Ce volume est directement proportionnel au volume de NPs injecté (5 μL) et nous donne donc des indications sur le volume qu'il serait nécessaire d'injecter pour recouvrir totalement la tumeur. Du fait de l'élimination lente des NPs injectées localement ($\tau \approx 250$ *min*), le recouvrement de la masse tumoral décroît faiblement au cours du temps, permettant d'envisager un traitement de radiothérapie même une heure après l'injection.

13.3 Comparaison de la prise de contraste au volume tumoral réel

Dans cette partie, nous avons cherché à comparer le volume tumoral imagé *in vivo* par prise de contraste iodé au volume tumoral réel. En effet, cette prise de contraste est spécifique de la région où la BHE est rompue mais très peu d'études valident la correspondance exacte entre cette région et l'intégralité du volume tumoral. Hors, les résultats présentés dans la section précédente, se basent sur la validité de cette hypothèse. Afin de définir le volume tumoral réel, deux techniques d'imagerie à haute résolution ont été utilisées : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la

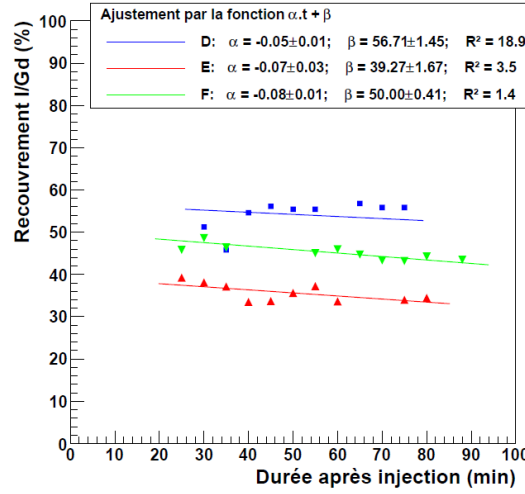


FIGURE 13.11 – Évolution du recouvrement du volume tumoral (défini comme étant le volume d'iode 10 minutes après injection) par les NPs de gadolinium, pour chaque animal de l'étude : D, E et F.

tomographie X par contraste de phase *via* la méthode de *grating interferometry*. L'analyse de ces images s'appuie sur une comparaison aux données histologiques des mêmes échantillons.

13.3.1 Prise de contraste iodé

Trois rats (A, B et C) porteurs d'un gliome F98 (J19 après l'implantation des cellules tumorales) ont été imaged *in vivo* par tomographie Synchrotron (SRCT, 35 keV), suite à l'injection intraveineuse d'iode (Ioméron® 1.5 mL à 350 mg/mL). Une caméra CCD très résolue (45 μ m) a été utilisée pour cette expérience et l'ensemble des paramètres d'acquisition est résumé dans la section 12.2.1.1, p. 199. La forte résolution joue en défaveur du contraste dans les images mais un simple ré-échantillonnage des niveaux de gris suffit pour visualiser l'iode au niveau de la tumeur. L'image 13.12 représente des coupes axiales du cerveau de chaque animal, imaged à différents temps après injection de l'AC. Les volumes d'iode sont segmentés coupe à coupe par la méthode décrite au paragraphe 12.2.1.2, à la page 199.

La figure 13.13 représente la cinétique d'élimination de l'AC à travers le volume d'iode mesuré en fonction du temps à partir des images de SRCT. Quelque soit le volume réel de la tumeur (qui est très différent pour chaque animal) la distribution est maximale aux temps précoces après injection (le premier scan a été réalisé environ 15 minutes après injection pour laisser le temps à l'AC de circuler dans le réseau sanguin). Sur ce scan, la concentration moyenne d'iode a été évaluée à 1.30, 1.52 et 2.4 mg/mL pour les animaux A, B et C respectivement. Le volume d'iode décroît ensuite rapidement, de manière exponentielle dans le temps. De la même façon que précédemment, une exponentielle mono compartimentale ($e^{-t/\tau}$) ajuste correctement les données, indiquant que l'élimination de l'iode se fait selon une voie principale, à savoir la reprise de l'AC par les capillaires sanguins. L'AC n'est plus visible au bout de quelques heures, mais ce temps est variable et dépend fortement du volume tumoral réel. L'animal A semble porter une tumeur beaucoup plus petite que

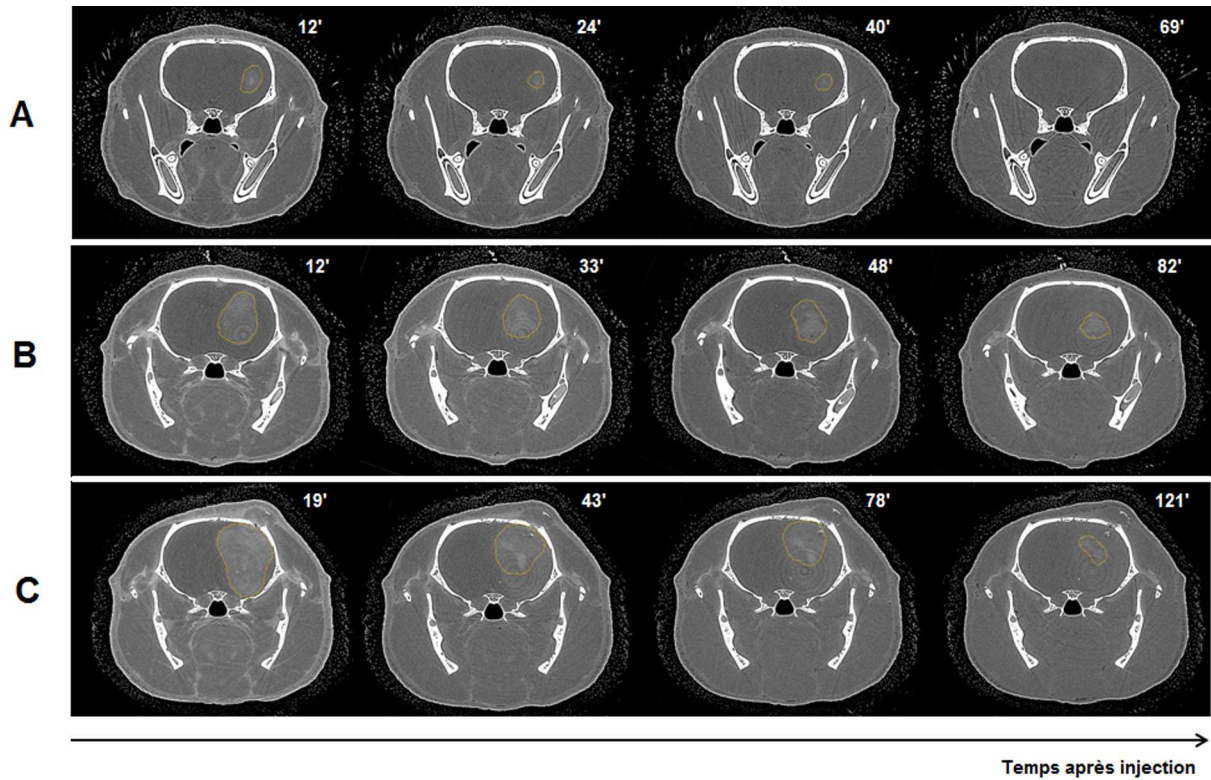


FIGURE 13.12 – Évolution du volume d'AC au cours du temps, pour chaque animal de l'étude : A, B et C. Le temps après injection auquel chaque scan correspond est indiqué sur chaque image (en minutes).

les animaux B et C ($V_{AC_{15'}} = 6 \text{ mm}^3$ pour l'animal A, contre 100 et 600 mm^3 pour les animaux B et C respectivement). Cela entraîne une disparition de l'AC très rapide ($\tau_A = 8.6 \pm 1.1 \text{ min}$ contre $\tau_B = 31.6 \pm 0.9$ et $\tau_C = 26.0 \pm 0.8 \text{ min}$).

13.3.2 Imagerie des tumeurs *ex vivo*

Les cerveaux des rats A, B et C ont été prélevés après élimination complète de l'AC et ont été imagés *ex vivo*, selon les protocoles d'imagerie anatomique par résonance magnétique et par contraste de phase, décrits aux sections 12.2.2.1 et 12.2.2.2 respectivement (p. 200 et 202). Ces deux modalités d'imagerie ont été utilisées et comparées dans le but d'obtenir des images à forte résolution pour caractériser avec le plus de détails possibles, les tumeurs cérébrales F98. Les images acquises par résonance magnétique ont une résolution de 39.1 μm dans le plan et de 200 μm dans la direction verticale. L'imagerie par contraste de phase permet d'obtenir une meilleure résolution : 14.7 μm dans les trois directions de l'espace pour les animaux B et C et poussée jusqu'à 7.5 μm pour l'animal A. Les planches 13.14, 13.15 et 13.16 présentent différentes coupes axiales du cerveau de chaque animal, selon les deux modalités d'imagerie. Les données histologiques auxquelles ont été comparées les images IRM et en contraste de phase, y figurent aussi. Les tissus ont été marqués par

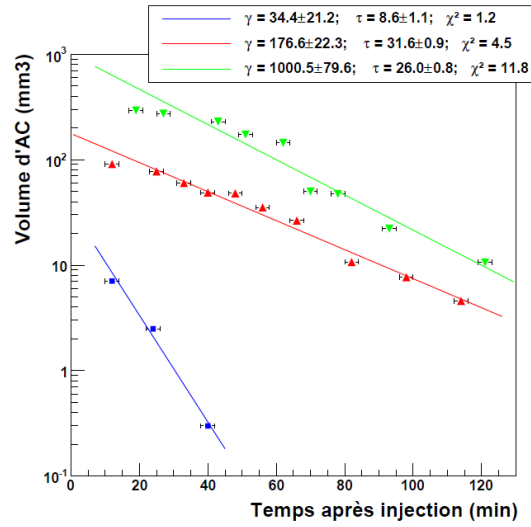


FIGURE 13.13 – Évolution du volume d'AC au cours du temps, pour chaque animal de l'étude : A (bleu), B (rouge) et C(vert). Les données expérimentales ont été ajustées par la fonction $\gamma.e^{-t/\tau}$

une coloration hématoxyline-éosine (HE). L'hémotoxyline est un colorant nucléaire violet tandis que l'éosine colore le cytoplasme en rose.

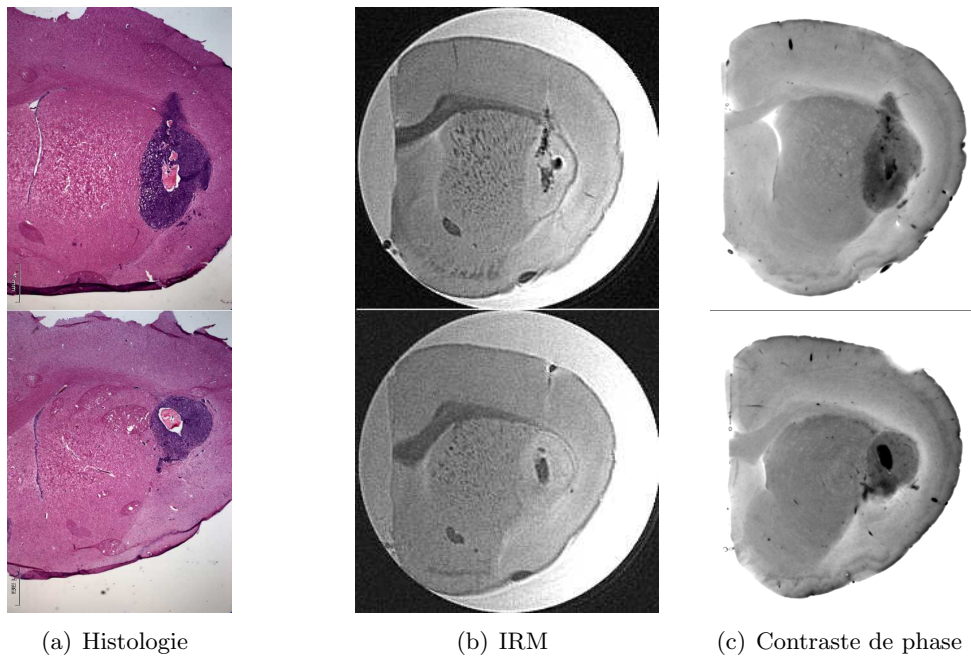


FIGURE 13.14 – (a) Coupes histologiques de l'hémisphère droit de l'animal A. (b) et (c) Coupes axiales correspondantes imagées par IRM et contraste de phase respectivement.

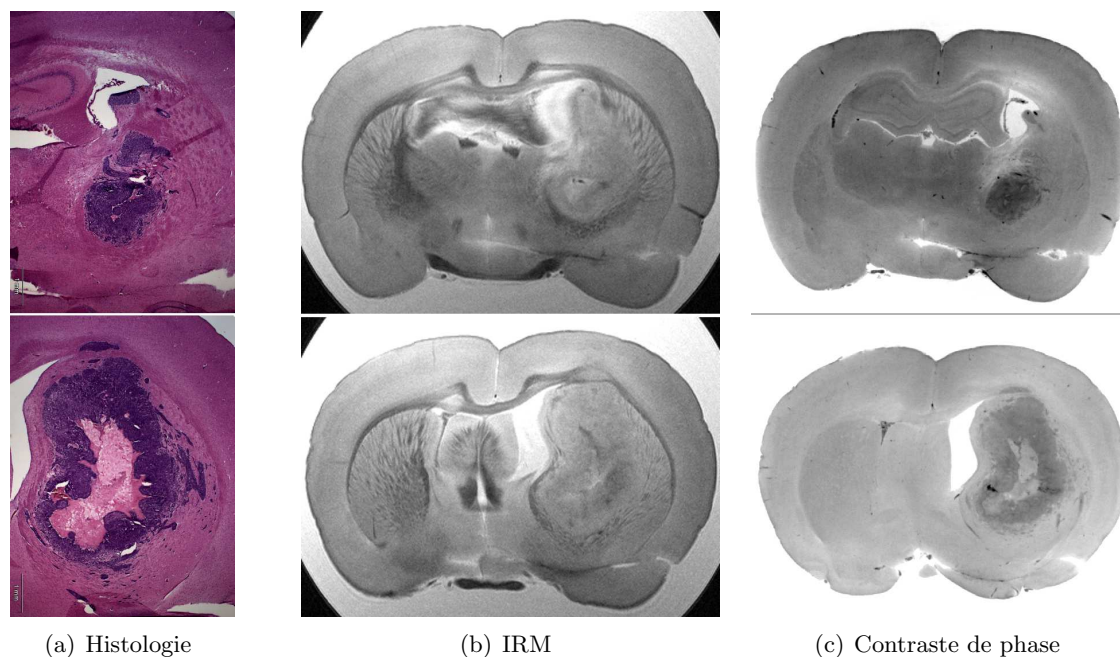


FIGURE 13.15 – (a) Coupes histologiques de l'hémisphère droit de l'animal B. (b) et (c) Coupes axiales correspondantes imagées par IRM et contraste de phase respectivement (cerveau entier).

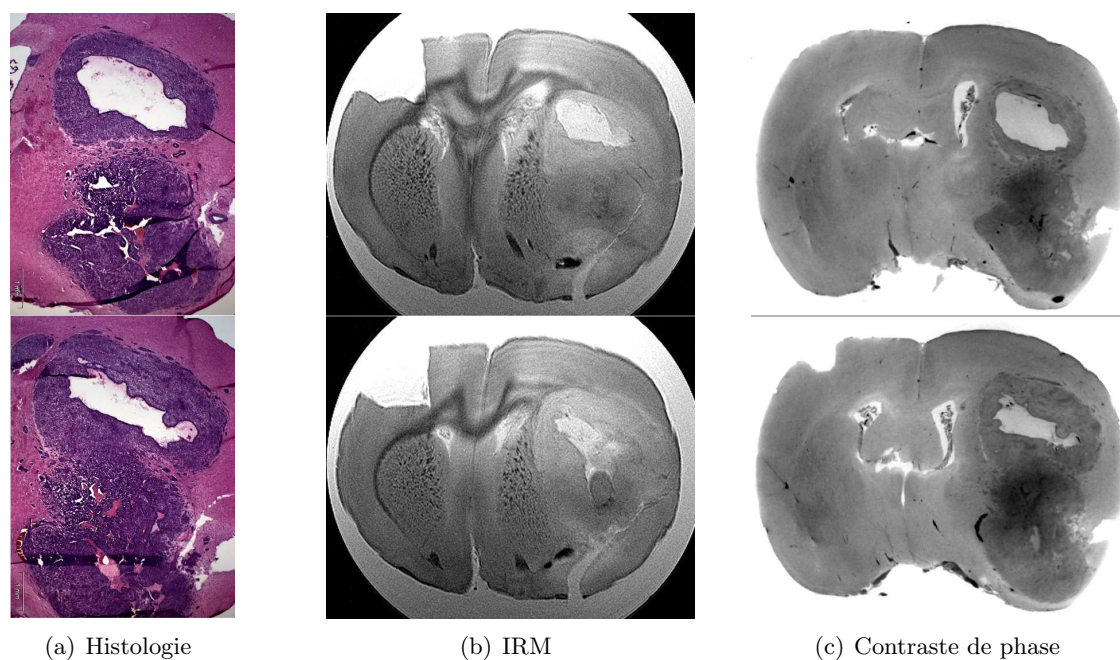


FIGURE 13.16 – (a) Coupes histologiques de l'hémisphère droit de l'animal C. (b) et (c) Coupes axiales correspondantes imagées par IRM et contraste de phase respectivement (cerveau entier).

13.3.2.1 Analyse qualitative

L'IRM et le contraste de phase permettent tous deux d'obtenir des images très détaillées des structures internes du cerveau. Cependant, les modalités d'imagerie ne donnent pas toujours les mêmes informations. Les coupes histologiques (dont le signal est mieux connu par les experts du domaine), permettent de confirmer les observations faites en IRM et contraste de phase X . La réalisation et l'analyse des coupes histologiques ont été réalisées en collaboration avec Chantal Rémy et Régine Farion (équipe 5 - GIN - Grenoble)

L'imagerie par IRM favorise le contraste entre les différentes structures tissulaires du cerveau sain notamment. Dans les images 13.17(a) et 13.17(b), nous distinguons parfaitement la matière blanche de la matière grise, jusqu'à pouvoir observer la structure fibreuse caractéristique du striatum. Les fibres myélinisées y apparaissent selon un assemblage régulier de fibres blanches et grises (cf. Fig. 13.17(b)). Le corps calleux (structure de substance blanche) apparaît également très nettement dans les images ainsi que différentes autres structures, comme, l'hippocampe, les commissures antérieures et le thalamus 13.17. Au niveau de la lésion, l'IRM utilisé à cette résolution, permet d'imager l'hétérogénéité des tissus tumoraux. De la même manière que dans une image pondérée en T2 que l'on obtient *in vivo*, les zones nécrotiques apparaissent en hypersignal (blanc), tandis que les régions hémorragiques apparaissent en hyposignal (noir).

L'imagerie X permet d'obtenir un contraste différent dans les images. Les différentes structures tissulaires du cerveau sain sont moins contrastées que dans les images IRM, bien que nous puissions tout de même observer l'hippocampe, le néocortex (couche externe des hémisphères cérébraux), les ventricules et le thalamus par exemple (cf. Fig. 13.17(c)). Le décalage de phase des RX interagissant dans les structures de matière blanche est proche de celui issu des structures de matière grise. La structure fibreuse du striatum n'est donc pas mise en évidence par contraste de phase X . Cependant, les détails au sein de la tumeur sont extrêmement marqués (cf. Fig. 13.17(d)). Nous observons une différence de contraste nette entre le cœur de la tumeur (qui pourrait être confondu avec de la nécrose mais qui correspond en fait à une région vide de cellules, à cause de l'agarose utilisé pour l'implantation des cellules tumorales) et les régions composées de cellules tumorales (qui apparaissent gris foncé et gris clair respectivement). Les plus gros vaisseaux induisent un signal très foncé dans les images (noir), qui correspond aux zones hémorragiques mises en évidence dans les images IRM (cf. Fig. 13.17(b) et 13.17(d), n° 10). Ces régions sont également visibles sur les coupes histologiques, où elles apparaissent en rouge plus foncé. L'importante résolution utilisée pour imager l'animal A ($7.5\ \mu m$) permet d'extraire une information très détaillée sur la vascularisation tumorale. L'image 13.18 met en évidence l'importance du réseau vasculaire, nécessaire au développement du gliome. On voit parfaitement les plus gros vaisseaux qui viennent nourrir la tumeur et qui apparaissent avec un signal très foncé dans les images acquises avec cette modalité d'imagerie (cf. Fig. 13.17(d)). L'imagerie par contraste de phase X est un outils qui s'avère très intéressant pour étudier l'efficacité des traitements qui ciblent la vascularisation cérébrale. Enfin, l'importante résolution associée au fort contraste entre tissus sains et tissus tumoraux, permettent d'observer l'infiltration des cellules tumorales dans des régions saines du cerveau, au delà des limites de la tumeur primaire (cf. Fig. 13.17(d), n° 11).

Finalement, les deux méthodes d'imagerie permettent d'observer la déformation du ventricule

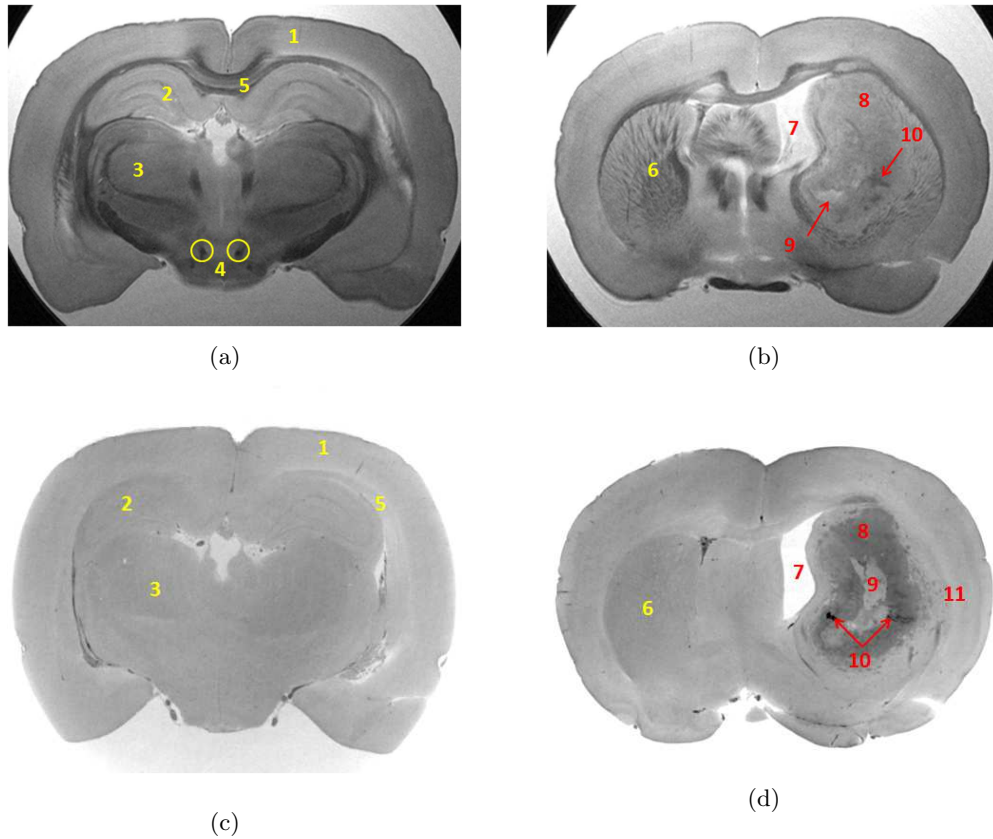


FIGURE 13.17 – (a) et (b) Coupes axiales acquises en IRM du cerveau de l’animal B dans une zone en antérieure à la tumeur et au centre de celle-ci respectivement. (c) et (d) Coupes axiales acquises par contraste de phase X dans le cerveau de l’animal B, dans des régions équivalentes aux images (a) et (b) respectivement. Les numéros jaunes indiquent des structures du cerveau normal. Les numéros rouges sont relatifs à la tumeur : 1, néocortex, 2, hippocampe, 3, thalamus, 4, commissures antérieures, 5, corps calleux, 6, striatum, 7, ventricule, 8, tumeur, 9, région vide de cellules et contenant l’agarose utilisé pour l’implantation tumorale, 10, régions hémorragiques et 11, infiltration des cellules tumorales dans les tissus sains.

droit (hémisphère où se trouve la tumeur). Cette déformation est caractéristique des tumeurs envahissantes qui empêchent l’écoulement du liquide céphalo-rachidien.

13.3.2.2 Analyse quantitative

Afin de quantifier le contraste obtenu dans les images IRM et par contraste de phase, nous avons choisi 7 structures caractéristiques pour lesquelles nous avons mesuré le contraste (C) deux à deux, en s’inspirant de la méthode proposée par *Schulz et al.* [Schu 12].

$$C = \frac{|S_i - S_j|}{\sigma_{S_i} + \sigma_{S_j}} \quad (13.1)$$

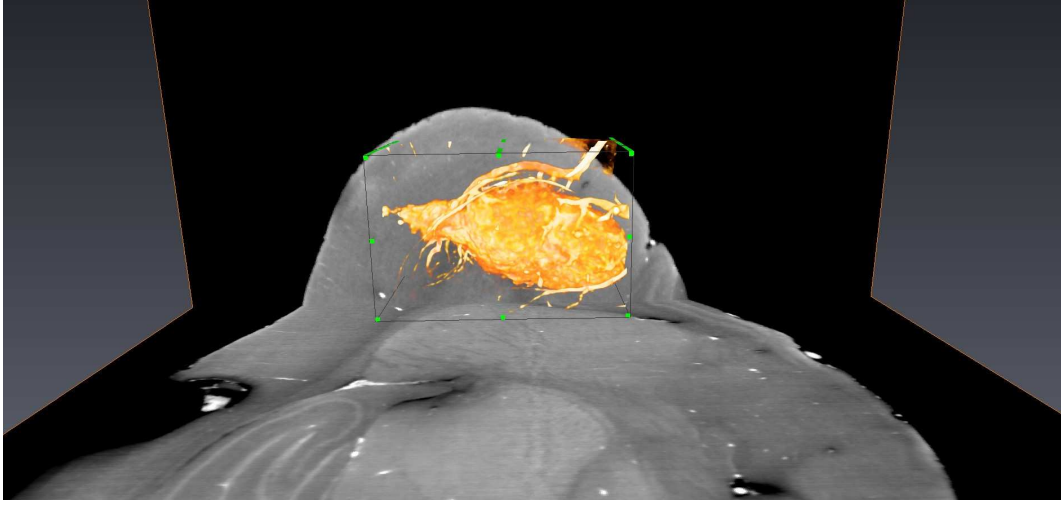


FIGURE 13.18 – Mise en évidence de la vascularisation de la tumeur chez l'animal A.

où S_i et S_j sont les signaux relatifs aux structures i et j comparées l'une à l'autre, et σ_S correspond à l'écart-type associé à la mesure du signal S . Dans tous les cas, le signal est mesuré dans les images 13.17(a), 13.17(b), 13.17(c) et 13.17(d), dans des ROI circulaires de 11 pixels de diamètre pour les images IRM et de 30 pixels de diamètre pour les images en contraste de phase (surfaces équivalentes). La figure 13.19 présente les mesures.

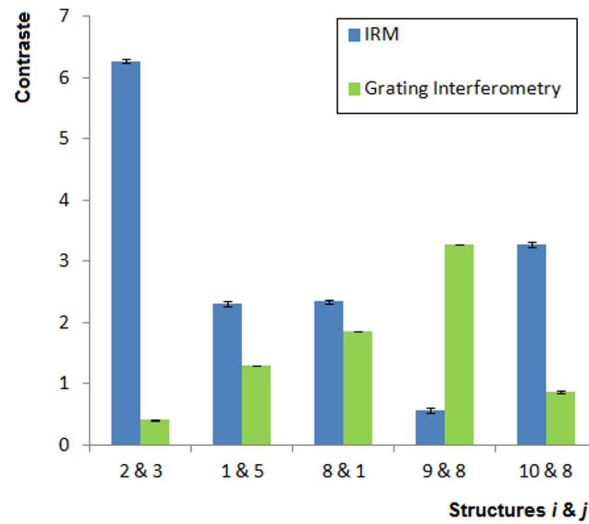


FIGURE 13.19 – Contraste entre les différentes structures du cerveau énumérées sur la figure 13.17, pour les acquisitions par IRM (bleu) et par contraste de phase (vert) : 1, néo-cortex, 2, hippocampe, 3, thalamus, 5, corps calleux, 8, tumeur, 9, régions vides de cellules (agarose) et 10, région hémorragique.

L'IRM permet d'obtenir un meilleur contraste entre toutes les structures considérées. Seul le contraste entre la tumeur (8) et son cœur (vide de cellules) (9) est plus important en contraste de phase ($C_{IRM}(8\&9) = 0.57 \pm 0.04$ et $C_{CdPh.}(8\&9) = 3.27 \pm 0.01$).

Le contraste entre les différentes structures des tissus sains est très faible dans les images en contraste de phase. Il vaut par exemple $0.41 \pm 0.01\%$ entre l'hippocampe et le thalamus et $1.30 \pm 0.01\%$ entre le néo-cortex et le corps calleux. Ces structures sont pourtant identifiables dans les images mais ce, principalement grâce aux frontières "physiques" qui les délimitent, et qui correspondent le plus souvent à des lignes fibreuses de matière blanche (capsule interne ou corps calleux par exemple).

13.3.3 Comparaison des différentes modalités d'imagerie

En plus de la quantité plus importante de détails obtenus dans les images, les méthodes d'imagerie à haute résolution considérées ici présentent l'avantage certain de pouvoir fournir une analyse 3D des tissus, ce que l'histologie ne permet pas. Grâce à l'important contraste entre tissus sains et tissus tumoraux, les tumeurs ont pu être segmentées par un algorithme de croissance de région (cf. 12.2.2.3, p. 204). Le tableau 13.5 regroupe les volumes tumoraux imagés *ex vivo* par IRM et *grating interferometry* et compare ces volumes à ceux imagés *in vivo*. Les temps après injection pour lesquels les volumes d'iode correspondent le mieux aux volumes réels sont indiqués.

Animal	A	B	C
$V_{IRM} (mm^3)$	4.1	46.1	133.1
$V_{GI} (mm^3)$	5.0	44.8	165.7
$V_{AC}=V_{IRM} (min)$	18	43	56
$V_{AC}=V_{GI} (min)$	17	44	48

TABLE 13.5 – Comparaison des volumes tumoraux imagés par les différentes techniques (IRM (V_{IRM}), *grating interferometry* (V_{GI}) et *in vivo* par SRCT après injection d'AC (V_{AC})). Les deux dernières lignes du tableau indiquent le temps après injection pour lequel les volumes d'AC correspondent aux volumes tumoraux imagés par IRM ou *grating interferometry*, pour chaque animal A, B et C.

Les volumes segmentés sont en assez bon accord entre les deux modalités d'imagerie. L'IRM sous-estime légèrement les volumes par rapport aux segmentations réalisées sur les images acquises en contraste de phase (écart-relatif $< 20\%$). Cette différence peut être due au fait que les coupes IRM sont espacées de $200 \mu m$, tandis que celles acquises en tomographie X sont beaucoup plus rapprochées ($\approx 15 \mu m$), permettant de définir plus précisément les limites de la tumeur.

Le temps pour lequel le volume d'AC représente le mieux la tumeur est variable entre les animaux. Il est d'autant plus long que la tumeur est volumineuse ($17 min$ pour l'animal A dont la tumeur mesure environ $5 mm^3$, contre $48 min$ pour l'animal C dont la tumeur mesure environ $166 mm^3$). Ces différences entre les animaux semblent fortement liées à la vascularisation tumorale. Le réseau vasculaire se développe de manière anarchique dans une région très large, au delà des limites de la tumeur primaire, comme le montre la figure 13.18. Lorsque l'iode y circule, il est susceptible de pénétrer dans les tissus cérébraux proches qui ne sont pas forcément malins mais qui sont au contact de ces vaisseaux aux parois poreuses. On suppose que cette large diffusion de l'AC est

responsable de la surestimation du volume tumoral mis en évidence *in vivo* aux temps précoces. Cette observation ne devra pas être négligée pour l'optimisation du recouvrement tumoral par les NPs injectées localement. D'autres études, impliquant certainement le recalage des images *in vivo* par rapport aux images *ex vivo*, semblent nécessaires afin de confirmer les raisons et les conséquences de ces différences.

13.4 Conclusion

L'objectif principal de cette dernière partie consistait à caractériser et à valider une méthode d'imagerie permettant de mettre en évidence la correspondance entre la distribution des NPs injectées localement dans le cerveau et le volume tumoral réel. Pour atteindre cet objectif, une méthode d'imagerie capable de séparer un minimum de trois éléments dans un mélange est nécessaire (tissu, iode (AC injecté par voie veineuse, qui marque la tumeur) et gadolinium (GdNPs injectées localement dans la tumeur)). La tomographie X à deux énergies le permet théoriquement et le set-up expérimental mis en place sur la ligne de lumière synchrotron ID17 a été utilisé pour cette application.

Dans un premier temps, l'imagerie de fantômes numériques a été simulée à l'aide du logiciel SNARK-89 pour définir les limites théoriques de la méthode. Une approche analytique a également été considérée pour définir le couple d'énergies optimal pour la détection de l'iode et du gadolinium, ainsi que les concentrations les plus petites détectables par le système.

Le couple d'énergies optimal est celui qui maximise les différences d'absorption des rayons X entre les deux images. Pour l'iode et le gadolinium, il s'agit de 33.3 et 50.3 keV. Ces deux énergies ne sont aujourd'hui pas utilisables simultanément sur ID17. Le monochromateur utilisé permet d'obtenir deux faisceaux séparés de 300 eV au maximum et le couple d'énergies expérimental a donc été choisi de manière à trouver le meilleur compromis entre maximisation des différences d'absorption des RX et contraintes expérimentales. Pour notre étude, l'encadrement du K-edge de l'iode (33.02 et 33.32 keV) est plus intéressant que l'encadrement du K-edge du gadolinium, car les concentrations d'iode (administré par voie veineuse) attendues *in vivo* sont plus faibles que celles attendues pour le gadolinium (injecté localement dans la tumeur).

La simulation des images du fantôme à 33.02 et 33.32 keV a donné des résultats en bon accord avec les calculs analytiques de *FOM* (*Figure Of Merit*) et de *MDC* (*Minimum Detectable Concentration*). En effet, des concentrations aussi faibles que 0.5 mg/mL, mais supérieures aux *MDC* théoriques (0.19 et 0.45 mg/mL pour l'iode et le gadolinium respectivement, et pour une dose totale de 0.096 Gy déposée à la surface d'un échantillon de 3 cm de diamètre), ont été correctement détectées. La dépendance de la *MDC* à la dose (D) délivrée par scan à la surface de l'objet et à sa taille (l), a été observée (cf. Fig. 13.1.1). En effet, le *SNR* augmente avec le nombre de photons détectés qui dépend de ces deux paramètres. La dose déposée doit donc être estimée en fonction de la *MDC* recherchée, de la dimension de l'objet et de l'application souhaitée.

Enfin, des mesures expérimentales sur fantômes (tubes contenant des solutions liquides d'eau, d'iode et de gadolinium) à 33.02 et 33.32 keV, ont permis de valider la détection simultanée de deux éléments lourds. Lorsque les concentrations sont assez grandes (3 mg/mL), l'erreur relative associée aux mesures reste inférieure à 5 et 20% pour l'iode et le gadolinium respectivement, ce qui est très prometteur pour une application pré-clinique. Lorsque les concentrations tendent vers les *MDC* théoriques, les mesures ne sont plus aussi exactes. La méthode expérimentale conduit à une augmentation de l'erreur relative entre les mesures et les valeurs théoriques des concentrations ainsi

qu'à l'apparition d'artéfacts dans les images (cf. Fig. 13.3 et 13.4).

Ces résultats peuvent être confrontés à ceux de la littérature. La majorité des travaux publiés jusqu'à maintenant décrit des systèmes d'imagerie utilisant des faisceaux de RX polychromatiques et une acquisition aux deux énergies non simultanée. Ces systèmes permettent de détecter précisément deux objets (eau et AC, ou, tissu et os par exemple), mais jamais trois. L'utilisation d'une troisième énergie devient indispensable pour cette dernière application [Mich 92]. Dans notre étude, nous montrons qu'il est possible d'imager trois éléments avec seulement deux énergies. L'hypothèse ($\sum_i f_{M_i} = 1$) faite pour la résolution du système d'équations (11.11) (décrit à la p. 180) permet d'extraire les fractions massiques relatives à trois éléments distincts mélangés dans un objet. Le monochromateur installé sur la ligne de faisceau ID17, décrit plus haut (12.1.1.1, page 188), permet d'assurer le caractère simultané de la méthode d'imagerie et donc de s'affranchir des problèmes de recalages d'images et d'artéfacts de mouvements qui pourront exister dans les applications *in vivo*.

La tomographie à deux énergies a ensuite été utilisée *in vivo*, pour l'imagerie simultanée d'un AC iodé et de GdNPs dans le cerveau d'un rongeur porteur d'un gliome. Les distributions des deux éléments ont été évaluées et quantifiées. Leurs cinétiques d'élimination ont également été analysées. Bien que les volumes de NPs injectés ne recouvrent pas complètement la tumeur avec le protocole choisi (le recouvrement est de l'ordre de 50% pour une injection de 5 μL de GdNPs dans une tumeur très développée (J19)), l'injection par voie directe des NPs permet une forte accumulation d'atomes lourds dans la tumeur (de l'ordre de 3.5 mg/mL) et une élimination lente dans le temps (environ 3 fois plus lente que l'AC). Cette concentration moyenne importante et relativement stable dans le temps, apparaît intéressante pour un traitement de radiothérapie synchrotron et la tomographie à deux énergies pourrait permettre d'optimiser les paramètres d'injection par CED (volume, débit, point d'injection) pour améliorer la distribution des NPs. De plus, la méthode d'imagerie a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des GdNPs au sein du volume tumoral ($45\% < \frac{\sigma_C}{C} < 80\%$). Cette hétérogénéité peut être fortement réduite par l'optimisation de l'injection locale. D'autre part, sa prise en compte dans le plan de traitement de radiothérapie (post-imagerie) permettrait de corriger la dose en conséquence. L'imagerie à deux énergies et la radiothérapie renforcée par éléments lourds deviennent deux techniques complémentaires pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie synchrotron.

Les résultats expérimentaux ont également été en bon accord avec les simulations. Pour le couple énergétique expérimental, la détection de l'iode est meilleure que celle du gadolinium où l'hétérogénéité des tissus est moins bien gérée. Les limites de détection ont été estimées *in vivo* à des concentrations de l'ordre de 0.5 mg/mL (valeurs qui dépendent fortement du couple d'énergies choisi et de la dose déposée à la peau de l'animal). Deux options sont actuellement envisageables pour réduire les artéfacts engendrés par l'hétérogénéité des tissus :

- L'utilisation d'une troisième (voire quatrième) énergie permettrait de mieux séparer les différents tissus (tissus mous et os) et donc de réduire les artéfacts dans les images *in vivo*. Cette possibilité est actuellement étudiée par Ludovic Broche (1^{ière} année de thèse au laboratoire) qui souhaite exploiter les différentes harmoniques du faisceau de RX afin d'améliorer la technique.
- Le retrait de l'os dans les images acquises aux deux énergies avant la séparation des éléments, permettrait de réduire les artéfacts liés à la présence de ce tissu. Ce traitement n'a pas été testé ici mais le repérage de l'os dans les données brutes est possible suite à sa segmentation dans les images reconstruites. Ce signal peut alors être supprimé des données brutes et les images peuvent être à nouveau reconstruites sans l'os.

L'étude de la distribution des NPs par rapport au volume tumoral se base sur une hypothèse im-

portante : la prise de contraste iodé représente correctement le volume tumoral. Dans une dernière partie, nous avons tenté de vérifier la validité de cette hypothèse. La prise et l'élimination du contraste iodé par la tumeur ont été imagées chez trois animaux porteurs de gliomes (SRCT - 35 keV). Une fois l'AC totalement éliminé, les cerveaux ont été prélevés et fixés afin d'imager les volumes tumoraux réels. Trois modalités d'imagerie à haute résolution ont été comparées : l'IRM anatomique, la tomographie X par contraste de phase et l'histologie. L'IRM anatomique ($39.1 \mu m$) et le contraste de phase (jusqu'à $7.5 \mu m$) ont tous deux permis d'obtenir une analyse histologique 3D très détaillée des tissus cérébraux. L'histologie classique a permis de vérifier la nature des structures mises en évidence. De manière générale, l'IRM donne un contraste plus important entre les différentes structures cérébrales considérées que le contraste de phase. Cependant, la très forte résolution des images acquises par contraste de phase X a permis d'obtenir une meilleure précision au niveau de la tumeur. L'hétérogénéité des lésions a largement été mise en évidence, avec la visualisation spatiale d'un coeur vide de cellules au centre (dû à l'utilisation d'agarose pour implanter les cellules tumorales) et de zones hémorragiques aux localisations assez dispersées. En IRM, ces zones hémorragiques apparaissent relativement diffuses (en hyposignal). Elles correspondent à une région mieux définie et intense en contraste de phase. Ce signal intense marque la présence de gros vaisseaux sanguins venant nourrir la tumeur.

D'autre part, les trois modalités d'imagerie s'accordent pour mettre en évidence la déformation du ventricule droit, caractéristique des tumeurs massives qui limitent l'écoulement du liquide céphalo-rachidien. L'imagerie par contraste de phase est également assez précise pour visualiser l'infiltration tumorale dans les tissus sains voisins de la tumeur primaire.

Enfin, le contraste entre tumeurs et tissus sains étant très marqué dans les deux modalités d'imagerie 3D, les volumes ont pu être segmentés et mesurés. Pour chaque animal, un bon accord entre IRM et contraste de phase a été observé (écart relatif $< 20\%$). Les volumes réels des tumeurs ne correspondent pas forcément aux volumes d'AC aux temps les plus précoces après injection. Plus la tumeur est grosse, plus le temps après injection pour lequel le volume d'AC correspond au volume réel est long. Cette différence semble s'expliquer essentiellement par la vascularisation tumorale qui est d'autant plus importante et anarchique que la tumeur est grosse. Ces différences entre volumes tumoraux réels et AC nécessitent d'autres études afin de préciser les conséquences thérapeutiques que cela peut avoir. La surestimation du volume de la tumeur peut s'avérer intéressante pour prendre en compte l'infiltration de cellules tumorales éloignées de la masse tumorale principale. Les conséquences thérapeutiques d'une irradiation de ces régions périphériques en présence de NPs ne sont cependant pas à négliger.

Conclusions & perspectives

Le traitement des tumeurs cérébrales de haut grade représente aujourd’hui encore, un réel challenge médical. Du fait de leur localisation sensible, de leur croissance diffuse et de la présence de la barrière hémato-encéphalique qui n’y est que partiellement rompue, les thérapies conventionnelles ont une efficacité limitée. L’association de la radiothérapie classique à un traitement adjuvant de temozolomide est aujourd’hui le traitement le plus efficace contre cette maladie [Stup 09a]. Bien qu’il conduise à une augmentation significative de la médiane de survie des patients, l’espérance de vie n’est toujours que d’environ 15 mois après diagnostic. Il est donc essentiel de continuer à développer de nouvelles modalités thérapeutiques pour améliorer ce pronostic.

La principale limite de la radiothérapie réside en la tolérance de dose des tissus sains. Pour augmenter la dose à la tumeur tout en respectant cette limite de tolérance, différentes options sont envisageables et la plupart ont été décrites dans la première partie de ce document (cf. partie 1.3.3, p. 17). La stratégie étudiée par l’équipe *Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale* dans laquelle s’inscrit ce travail, consiste à renforcer le dépôt de dose de manière spécifique dans la tumeur, en l’ayant chargée avec des atomes de numéro atomique élevé ($Z > 50$) au préalable d’une irradiation externe de rayons X de basses énergies (50 - 100 keV). L’augmentation de dose est due à la plus grande probabilité d’interaction des photons de cette énergie avec les atomes lourds, par effet photoélectrique principalement. Ce traitement a été évalué sur un modèle de rongeurs porteurs d’un gliome F98 et ayant reçu une injection intraveineuse d’iode (sous forme d’agent de contraste (AC)), suivie d’un traitement de radiothérapie utilisant un rayonnement synchrotron de 50 keV. L’irradiation combinée a conduit à une augmentation significative de la survie des animaux par rapport à la radiothérapie seule, mais n’a pas conduit à une guérison complète des animaux traités [Adam 03]. Cette augmentation s’est montrée dépendante de la concentration en iode accumulée au niveau de la tumeur, qui, elle même se trouve limitée par la présence de barrière hémato-encéphalique [Adam 06]. Ce traitement fait aujourd’hui l’objet d’essais cliniques chez l’homme, avec pour premier objectif de montrer la faisabilité du protocole au synchrotron. En parallèle de cet essai clinique, des études pré-cliniques sont conduites dans l’équipe afin de trouver des solutions pour augmenter l’efficacité biologique du traitement. L’utilisation de nanoparticules (NPs) au lieu d’un AC semble permettre d’augmenter cette efficacité et c’est à partir de cette observation qu’est née la problématique générale de ce travail de thèse.

Le but principal de ce travail a été d’étudier l’efficacité biologique d’une irradiation de photons en présence de NPs. Trois types de NPs ont pu être étudiés au cours de ce projet : des NPs de gadolinium (3 nm), provenant du laboratoire de Physico Chimie des Matériaux Luminescents, UMR 5620, Lyon, dans le cadre d’une collaboration avec l’équipe d’Olivier Tillement. Et des NPs d’or (13 nm) et de platine (6 nm), fonctionnalisées avec un peptide spécifique d’un récepteur de

la membrane nucléaire et provenant d'une collaboration avec Boris Kysela, Université de Birmingham, UK. Cette étude a été réalisée à deux échelles : celle de la cellule, pour comprendre d'une part, les mécanismes de toxicité et d'internalisation propres aux NPs et d'autre part, identifier les mécanismes de radiosensibilisation responsables de l'augmentation de la radiotoxicité dans ce traitement. L'autre partie a été réalisée à l'échelle tumorale, sur un modèle de rongeurs porteurs d'un gliome F98. Elle a consisté d'une part, à conduire un essai pré-clinique de thérapie associant nanoparticules d'or et radiothérapie synchrotron. D'autre part, nous avons caractérisé et mis en place une méthode de tomographie à deux énergies pour l'imagerie simultanée de la tumeur (mise en évidence par prise de contraste iodé) et la distribution des NPs injectées par voie directe. L'optimisation du recouvrement de la tumeur par les NPs constitue en effet, un point incontournable pour la réussite du traitement *in vivo*.

Toxicité et internalisation des NPs

La toxicité des NPs et leur localisation subcellulaire lorsqu'elles sont mises au contact de cellules sont deux questions qui se sont posées aux prémices de ce travail. En effet, afin de mettre en évidence les mécanismes de radiotoxicité en combinaison à une irradiation et de mesurer les conséquences de l'hétérogénéité de dose créée par leur présence, il est essentiel de connaître avec précision ces deux paramètres. Les trois modèles de NPs utilisés dans cette étude (GdNPs, AuNPs et PtNPs) nous ont permis d'observer une diversité importante des comportements et de mettre en évidence certains phénomènes.

L'internalisation des NPs dépend de leur taille puisque les PtNPs (synthétisées de la même manière que les AuNPs mais avec un diamètre 2 fois plus petit (6 nm et 13 nm respectivement)) ont été internalisées de l'ordre de 5 fois moins que les AuNPs. De la même manière que d'autres études, nous observons une internalisation plus favorable des NPs de plus grand diamètre [Chit 09] [Chau 11]. D'autre part, la diffusion passive des GdNPs ultra fines (< 5 nm) a été observée chez les cellules F98. Ce phénomène, bien que minoritaire par rapport à un mécanisme d'adsorption actif, met en évidence le transport des NPs de petites tailles par simple diffusion mécanique à travers les membranes cellulaires. Cette observation est en accord avec les résultats de Rima *et al.* qui ont pu quantifier l'importance des mécanismes actifs et passifs pour des NPs semblables chez les cellules SQ20B [Rima 13]. Enfin, la vectorisation des Au et PtNPs n'a pas pu être discutée dans ce travail du fait de la discrétion de nos collaborateurs sur la composition des peptides utilisés. Nous avons uniquement pu constater que le peptide que nous avons appelé *peptide 3*, conduisait à une concentration internalisée légèrement plus grande, mais non significativement différente, que le *peptide 1* (facteur 1.5 environ). La poursuite de la collaboration avec cette équipe va permettre d'étudier plus en détails ce paramètre et des études de microscopie électronique en transmission permettraient de vérifier la localisation intra nucléaire des NPs ainsi vectorisées.

La toxicité propre à chaque type de NPs a également été évaluée sur le modèle cellulaire F98. Nous avons pu observer une dépendance de la toxicité (mesurée par tests clonogéniques) au protocole d'incubation. Ainsi, une exposition de 24h en présence de 2.1 mg/mL de gadolinium sous forme de GdNPs diminue la survie des cellules F98 d'un facteur 3. Une exposition de 5h avec la même concentration de gadolinium ne diminue pas de manière significative la survie cellulaire. La diminution de la concentration d'incubation permet d'exposer plus longtemps les cellules aux NPs sans diminuer leur survie. En effet, les Au et PtNPs ont pu être incubées 24h à la concentration

en atomes lourds de 0.46 et 0.045 mg/mL respectivement, sans avoir de conséquences sur la survie des cellules. Enfin, il a été mis en évidence que, bien que non toxique (en terme de survie), une incubation en présence de NPs peut être influente sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire. Les NPs d'or et de gadolinium (les fortement concentrées dans les cellules après incubation) ont toutes deux engendré une accumulation des cellules en G2/M, mesurée 24h après la fin de la période d'incubation ($57 \pm 28\%$ pour les GdNPs et $31 \pm 11\%$ et $26 \pm 12\%$ pour les AuNPs *peptide 1* et *3* respectivement). Les GdNPs entraînent également un arrêt de la prolifération qui a pu être mesuré jusqu'à 3 jours après l'incubation. Ces observations laissent supposer que les NPs peuvent créer des dommages qui, aux concentrations d'incubation choisies ici, peuvent être réparés par les cellules. Ce phénomène a été observé par ailleurs [Lewi 10] [Aror 12] [Jena 12], mais des expériences complémentaires de quantifications des dommages de l'ADN seraient nécessaires afin de le vérifier pour nos modèles.

In vivo enfin, les injections directes de NPs dans le noyau caudé de rats sains ont été bien tolérées que ce soit pour les GdNPs (110 μg , 5 μL) ou les AuNPs ($1.5 \cdot 10^{-2}$ μg , 10 μL) (les PtNPs n'ont pas été utilisées *in vivo*). Cette observation s'est montrée très encourageante pour la perspective d'essais pré-cliniques. La dépendance de la tolérance en fonction de la quantité de NPs injectées peut être discutée avec les résultats de Laure Bobyk qui a évalué la tolérance de AuNPs (1.9 nm et 15 nm) avec le même modèle animal et protocole que ceux utilisés ici, mis à part une quantité de NPs injectées plus importante : 250 μg , 5 μL . La mort précoce de 75% des animaux dans les 24h suivant l'irradiation, a été observée pour l'injection des plus petites NPs. La quantité de NPs n'est pas le seul paramètre influençant la toxicité *in vivo* puisque les AuNPs de 15 nm injectées à la même concentration (250 μg , 5 μL), n'ont pas eu de conséquences sur les animaux [Boby 13]. La diversité de ces observations renforce la nécessité de caractériser de manière très rigoureuse chaque modèle de NPs et de s'assurer de la reproductibilité de leur synthèse avant d'envisager une utilisation chez l'homme.

Mécanismes de radiosensibilisation propres aux NPs

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a consisté à évaluer les capacités de radiosensibilisation des NPs. A l'échelle de la cellule, différentes expériences ont été réalisées pour répondre à deux questions importantes : L'irradiation nécessite-t-elle l'utilisation d'un rayonnement de basse énergie ? Cette question revient à identifier les mécanismes de radiosensibilisation mis en jeu. Et l'efficacité biologique de l'irradiation en présence de nanoparticules est-elle plus importante que lorsque les atomes lourds sont utilisés sous forme d'agent de contraste ?

Un effet préférentiel des basses énergies a été observé pour les NPs d'or et de gadolinium. Ces deux types de NPs ont été celles les plus fortement concentrées à l'intérieur ou sur les membranes des cellules après incubation (à hauteur de 0.6 $pg/cell$ en moyenne). Cette dépendance en fonction de l'énergie des photons incidents ne signifie pas qu'une irradiation à haute énergie n'entraîne aucun effet puisqu'il a par exemple été montré que la présence des GdNPs adsorbées sur les membranes au moment de l'irradiation, augmentait la mort cellulaire de 23% pour une irradiation de 4 Gy à 1.25 MeV . D'autre part, les PtNPs, internalisées à plus faible concentration (de l'ordre de 0.01 $pg/cell$) ont conduit à une augmentation de la mort cellulaire dont l'amplitude s'est montrée presque constante en fonction l'énergie d'irradiation (entre 20 et 30% pour les trois énergies utilisées : en

dessous, au dessus du K-edge du platine ou à haute énergie (1.25 MeV)). Ces observations importantes nous ont permis de mettre en évidence la présence d'un mécanisme de radiosensibilisation différent de la photoactivation des atomes lourds et propre aux NPs. Il semblerait également que la photoactivation des NPs n'ait de conséquences sur la survie cellulaire que si elles sont suffisamment nombreuses.

La comparaison de l'efficacité biologique d'une irradiation associée à un AC ou à des NPs a été évaluée pour le gadolinium. Lorsque les cellules sont irradiées en présence d'AC, il a été montré que leur survie diminuait de manière proportionnelle à la concentration en gadolinium et que seule l'augmentation de dose expliquait cet effet puisqu'une irradiation à 1.25 MeV n'augmentait pas la radiotoxicité par rapport à une irradiation sans gadolinium. D'autre part, il est intéressant de remarquer que l'indicateur de survie cellulaire que nous avons choisi (le $SE_{R_{4Gy}}$) est parfaitement corrélé au facteur d'augmentation de dose (DEF) calculé à l'échelle macroscopique par simulations Monte Carlo. Ces deux facteurs ne représentent pas la même grandeur et ne peuvent donc pas être comparées de manière absolue, mais cette forte correspondance indique que les phénomènes locaux autour des atomes de gadolinium ne sont pas les plus importants lorsque l'irradiation est réalisée en présence d'un AC (moléculaire et externe aux cellules). Les photo-électrons de plus grands parcours, qui contribuent à un dépôt de dose homogène dans le milieu, sont les responsables principaux de l'augmentation de la mort cellulaire.

Les GdNPs se sont comportées différemment. L'augmentation de la mort cellulaire suit la même forme que l'augmentation de dose en fonction de l'énergie des photons incidents, mais l'amplitude de l'effet est bien plus grande que celle relative à l'AC. A quantité d'atomes lourds égale, les NPs ont conduit à une augmentation de la mort cellulaire jusqu'à 250% plus importante qu'une irradiation seule, tandis que l'AC n'a permis d'augmenter l'effet que de 40% au maximum (irradiation à 65 keV). D'autre part, une irradiation en présence de GdNPs adsorbées sur les membranes cellulaires et externes aux cellules en même temps, a permis de mettre en évidence l'augmentation importante du rapport α/β , caractérisant la courbe de survie $S(D)$ et qui donne une indication sur la qualité du rayonnement. Ce rapport a été mesuré à $0.05 \pm 0.01 Gy$ pour une irradiation seule et à $29.6 \pm 3.2 Gy$ pour une irradiation en présence de GdNPs (*externes + adsorbées*). Cette forte augmentation indique l'apparition de nombreux dommages aux conséquences létales pour les cellules. La courbe de survie perd son épaulement caractéristique d'une irradiation de bas TEL et montre une relation plus proche de celle d'un rayonnement de haut TEL. Cette caractéristique n'a pas été observée pour le gadolinium sous forme d'AC, et ce jusqu'à une concentration de 10 mg/mL, bien supérieure à celles utilisées pour les GdNPs.

Il est intéressant de noter qu'encore une fois cet effet semble dépendre du type de NPs (ou de leur localisation subcellulaire). En effet, les AuNPs internalisées dans le cytoplasme des cellules à une concentration du même ordre de grandeur que les GdNPs (0.6 pg/cell) ont conduit à une augmentation maximale de la mort cellulaire de 30% par rapport à une irradiation seule. Cette différence importante par rapport aux GdNPs, peut s'expliquer par deux raisons principales : en plus de la photoactivation, les GdNPs sensibilisent fortement les cellules F98 au rayonnement par un mécanisme biologique différent. La perturbation du métabolisme des cellules après une incubation en présence des GdNPs (arrêt de la prolifération et du cycle cellulaire) appuie fortement cette hypothèse. Ou bien, la localisation membranaire des GdNPs favorise l'efficacité biologique de l'irradiation par rapport à la localisation intra-cellulaire. Les simulations de l'augmentation de

dose locale ont montré que la localisation des NPs sur les membranes augmentait fortement le DEF dans cette région ($DEF_{max} = 1.43$ à la membrane contre 1.09 et 1.05 au cytoplasme et au noyau respectivement) [Delo 13]. La taille des différents volumes considérés dans les simulations (membrane, cytoplasme et noyau) ont bien sûr une importance très grande dans ces différences, mais il est indéniable que la forte augmentation du nombre d'électrons de basse énergie produits autour des NPs joue un rôle dans cette augmentation de dose à la membrane. Des expériences complémentaires permettant de mesurer les dommages membranaires des cellules ainsi irradiées, seraient intéressantes afin de vérifier notre hypothèse qui semble indiquer une importance des membranes dans la réponse cellulaire. La majorité des études s'intéressent à l'ADN. Les membranes cellulaires, certainement plus faciles à cibler que l'ADN, peuvent néanmoins constituer une cible importante à favoriser pour notre application. De plus, on pourrait imaginer fonctionnaliser les NPs pour cibler des récepteurs membranaires spécifiques des cellules tumorales comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) par exemple. Cette étape est complexe puisque toutes les cellules tumorales n'expriment pas les mêmes récepteurs et les NPs ne se comportent pas forcément de la même façon quand elles sont fonctionnalisées ou non. Cette piste constitue donc un réel défi qu'il est intéressant d'explorer pour maximiser le différentiel entre cellules tumorales et cellules saines *in vivo*.

Perspectives pour améliorer l'efficacité biologique des NPs *in vivo*

In vivo enfin, un essai thérapeutique a été conduit sur des rongeurs porteurs d'un gliome F98 qui ont été traités par radiothérapie synchrotron en présence de AuNPs. Le traitement combiné a permis d'augmenter au maximum de 75% la survie moyenne des animaux par rapport aux animaux témoins, mais cette augmentation n'a pas été significative par rapport au bénéfice de la radiothérapie seule et les animaux sont tous décédés rapidement après le traitement. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de *Bobyk et al.* n'ayant pas observé d'augmentation significative de la survie des animaux traités par la combinaison NPs/ *RX* par rapport aux rayons *X* seuls (même modèle animal que le notre) [Boby 13]. Ils contrastent par contre avec ceux de *Hainfeld* ayant montré une efficacité importante sur un modèle de souris porteuses de gliome [Hain 12]. Dans cette étude, les animaux ont cependant été traités par une fraction unique de 30 Gy. Cette dose ne respecte pas la tolérance des tissus sains et les effets à long termes qui pourraient en découler ne sont pas compatibles avec une utilisation clinique.

A ce stade du projet, il nous a semblé important de chercher un moyen pour optimiser le recouvrement de la tumeur dans sa globalité, par les NPs. L'injection intracérébrale directe offre de nombreux avantages par rapport à une injection par voie veineuse, comme par exemple d'accumuler une plus forte concentration d'atomes lourds dans la tumeur, de s'affranchir de la présence de la barrière hémato-encéphalique et de réduire la toxicité systémique de certains composés [Bobo 94]. Dans le cas des nanoparticules, elle permet aussi de nettement réduire le volume injecté, qui représenterait un coût financier trop important pour tester l'efficacité d'un traitement sur un modèle animal. En effet, les NPs sont pour le moment onéreuses et l'accumulation d'une quantité suffisante (pour de la photoactivation) au niveau d'une tumeur cérébrale nécessiterait une injection d'un volume trop important par voie veineuse. Cependant, le volume de distribution de la solution injectée par voie directe ne représente plus aussi précisément la masse tumorale que lorsque la solution s'accumule par effet EPR dans la tumeur. Or, le recouvrement de la totalité des cellules tumorales par les

NPs est essentiel pour maximiser l'efficacité thérapeutique de la radiothérapie. Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons mis en place un moyen efficace pour imager la distribution des NPs injectées par voie directe *in vivo*, par rapport au volume tumoral. La tumeur pouvant être mise en évidence par une prise de contraste iodé, l'enjeu a été d'imager de manière simultanée deux éléments lourds, mélangés dans le cerveau d'un petit animal.

Un set-up expérimental dédié a été mis en place sur la ligne médicale du synchrotron pour quantifier de manière simultanée jusqu'à trois éléments contenus dans un même volume. La méthode de tomographie à deux énergies que nous avons utilisée se base sur l'acquisition d'une même coupe tomographique avec deux faisceaux d'énergies différentes. Elle a été caractérisée pour l'imagerie simultanée d'un mélange d'iode, de gadolinium et d'eau. Une approche analytique a permis de trouver le couple d'énergies optimal, qui maximise la séparation des deux éléments lourds tout en respectant la contrainte expérimentale qui impose l'utilisation de faisceaux dont les énergies sont séparées de 300 eV au maximum. L'encadrement du K-edge de l'iode est apparu comme le meilleur compromis pour notre application. Les concentrations les plus petites détectables avec le système ont été mesurées à partir de fantômes. Avec le couple d'énergies choisi, l'iode a pu être détecté jusqu'à une concentration proche de 0.5 mg/mL tandis que le gadolinium nécessite d'être plus fortement concentré (de l'ordre du mg/mL). L'imagerie des deux éléments lourds est quantitative et les concentrations ont été extraites dans les volumes avec une exactitude, qui dépend de la concentration de l'élément, mais qui semble satisfaisante pour une application pré-clinique. *In vivo*, nous avons pu correctement séparer la distribution des GdNPs (injectées par voie directe) et l'AC (injecté par voie veineuse). L'hétérogénéité des tissus (la présence de l'os notamment) peut limiter la segmentation du gadolinium si celui-ci se trouve au contact de la boîte crânienne, mais ce problème n'a que peu d'importance dans notre étude puisque la tumeur est située en profondeur dans le tissu cérébral. Le caractère simultané de la méthode permet de s'affranchir totalement des problèmes de recalage d'images et d'artéfacts de mouvements, qui restent des problèmes complexes de traitement d'images. Enfin, l'utilisation de rayons X monochromatiques permet de quantifier précisément la concentration des éléments, ce qui apporte une amélioration importante à la technique de tomographie à deux énergies, qui, jusqu'à maintenant avait essentiellement été utilisée à partir de spectres polychromatiques.

Cette dernière partie de thèse donne lieu à de nombreuses perspectives. La plus directe concerne bien entendu l'optimisation des paramètres d'injection des NPs par CED (volume, débit, point d'injection) afin de maximiser le recouvrement de la tumeur. La méthode de tomographie à deux énergies maintenant disponible sur ID17 est idéale pour réaliser cette étude et nous sommes persuadés que la radiosensibilisation tumorale ne peut être efficace que si la quasi totalité des cellules tumorales est touchée par les NPs. D'autre part, les conséquences pourraient être graves si les NPs étaient majoritairement distribuées en dehors de la tumeur. Le protocole d'imagerie développé ici pourrait être utilisé en amont de la radiothérapie pour contrôler la distribution des NPs par rapport au volume tumoral. Il serait ensuite intéressant d'utiliser la cartographie 3D de la concentration des NPs pour ajuster le plan de traitement. En effet, nous avons pu mettre en évidence au cours de ce travail que la concentration des NPs n'était pas nécessairement homogène dans le volume cible. Les conséquences dosimétriques de cette hétérogénéité peuvent être plus ou moins importantes, mais pourraient en partie être corrigées par l'intégration de la distribution des NPs dans le plan de traitement du patient.

L'étude d'imagerie que nous avons proposée ici repose sur l'hypothèse importante que la prise de contraste iodé représente correctement le volume tumoral. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse au cours de ce projet. L'imagerie par contraste de phase et l'IRM haute résolution nous ont permis de caractériser en détails notre modèle de gliome et de mesurer le temps après injection pour lequel le volume d'AC correspond le mieux au volume tumoral. Une mesure complémentaire sur davantage d'animaux permettrait de confirmer le résultat mais nos mesures préliminaires tendent à conclure à une relation exponentielle entre ces deux grandeurs, avec un volume d'AC qui surestime la volume tumoral aux temps précoces après l'injection. La prise en compte de ce décalage n'est pas à négliger et la stratégie thérapeutique à adopter vis à vis de ce résultat nécessite d'être discutée. La plus grande distribution de l'AC aux temps précoces après injection peut s'avérer intéressante pour définir une marge autour de la tumeur qui engloberait les cellules infiltrées et les vaisseaux qui nourrissent la tumeur. Cependant, les conséquences biologiques d'une telle irradiation nécessitent d'être étudiées plus en détails pour trancher sur cette question.

Lorsque les paramètres d'injection des NPs seront optimum pour maximiser le recouvrement de la tumeur, nous pourrions envisager de nouveaux essais pré-cliniques. Les résultats obtenus *in vitro* dans le cadre de ce travail, laissent penser que l'association de NPs (injectées par voie directe) et d'un AC (injecté par voie veineuse) permettrait d'obtenir l'efficacité thérapeutique la plus grande, dans le cadre d'un traitement par radiothérapie synchrotron. En effet, nous l'avons observé *in vitro*, l'augmentation de dose macroscopique inhérente à la présence de nombreux atomes lourds dans le milieu extra-cellulaire au moment de l'irradiation, peut maximiser l'efficacité biologique des NPs internalisées ou adsorbées par les cellules, en augmentant le nombre ou la complexité des dommages radio-induits. Cette effet passe bien entendu par une distribution subcellulaire des NPs *in vivo* optimale, qu'il faudra également prendre en compte pour choisir le meilleur modèle de NPs.

Bibliographie

- [Abbo 10] N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof, and D. J. Begley. “Structure and function of the blood-brain barrier.”. *Neurobiology of disease*, Vol. 37, No. 1, pp. 13–25, Jan. 2010. [12](#)
- [Abde 10] W. Abdel-Rahman and E. Podgorsak. “Energy transfer and energy absorption in photon interactions with matter revisited : A step-by-step illustrated approach”. *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 79, No. 5, pp. 552–566, May 2010. [29](#)
- [Adam 03] J. F. Adam, H. Elleaume, A. Joubert, M. C. Biston, A. M. Charvet, J. Balosso, J. F. Le Bas, and F. Estève. “Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent : first trial on rats bearing F98 gliomas.”. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Vol. 57, No. 5, pp. 1413–26, Dec. 2003. [2](#), [57](#), [58](#), [198](#), [229](#)
- [Adam 06] J. F. Adam, A. Joubert, M. C. Biston, A. M. Charvet, M. Peoc’h, J. F. Le Bas, J. Balosso, F. Esteve, and H. Elleaume. “Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy”. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 64, No. 2, pp. 603–611, 2006. [2](#), [57](#), [58](#), [229](#)
- [Alba 11] A. Albanese and W. C. W. Chan. “Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity.”. *ACS nano*, Vol. 5, No. 7, pp. 5478–89, July 2011. [69](#)
- [Alle 09] N. J. Allen and B. A. Barres. “Neuroscience : Glia - more than just brain glue.”. *Nature*, Vol. 457, No. 7230, pp. 675–7, Feb. 2009. [10](#), [11](#)
- [Alva 76] R. E. Alvarez and A. Macovski. “Energy-selective reconstructions in X-ray computerised tomography”. *Physics in Medicine and Biology*, Vol. 21, No. 5, pp. 733–744, Sep. 1976. [177](#), [178](#), [179](#)
- [Aror 12] S. Arora, J. M. Rajwade, and K. M. Paknikar. “Nanotoxicology and in vitro studies : the need of the hour.”. *Toxicology and applied pharmacology*, Vol. 258, No. 2, pp. 151–65, Jan. 2012. [66](#), [119](#), [231](#)
- [Badi 95] C. Badie, G. Iliakis, N. Foray, G. Alsbeih, B. Cedervall, N. Chavaudra, G. Pantelias, C. Arlett, and E. P. Malaise. “Induction and Rejoining of DNA Double-Strand Breaks and Interphase Chromosome Breaks after Exposure to X Rays in One Normal and Two Hypersensitive Human Fibroblast Cell Lines”. May 1995. [41](#)
- [Bare 63] G. W. Barendsen, H. M. Walter, J. F. Fowler, and D. K. Bewley. “Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. III. Experiments with cyclotron-accelerated alpha-particles and deuterons.”. *Radiation research*, Vol. 18, pp. 106–19, Jan. 1963. [22](#)

- [Bart 09] R. F. Barth and B. Kaur. “Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology : the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas”. *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 94, No. 3, pp. 299–312, Sep. 2009. [82](#), [83](#)
- [Beau 09] M. Beaumont, B. Lemasson, R. Farion, C. Segebarth, C. Rémy, and E. L. Barbier. “Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using iron-based vessel size index MRI in combination with gadolinium-based dynamic contrast-enhanced MRI.”. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Vol. 29, No. 10, pp. 1714–26, Oct. 2009. [12](#)
- [Bena 86] A. L. Benabid, C. Remy, and C. Chauvin. “Experimental models of rat brain tumors by stereotactic injection of C6 glioma and HTC hepatoma cell lines”. In : M. Walker and D. Thomas, Eds., *Biology of brain tumour*, pp. 221–226, 1986. [148](#)
- [Berb 11] R. I. Berbeco, W. Ngwa, and G. M. Makrigiorgos. “Localized dose enhancement to tumor blood vessel endothelial cells via megavoltage X-rays and targeted gold nanoparticles : new potential for external beam radiotherapy.”. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Vol. 81, No. 1, pp. 270–6, Sep. 2011. [73](#), [74](#)
- [Berg 99] M. J. Berger, J. S. Coursey, M. A. Zucker, and J. Chang. *Stopping-Power and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions*. 1999. [31](#)
- [Bing 03] S. Bingaman, V. H. Huxley, and R. E. Rumbaut. “Fluorescent dyes modify properties of proteins used in microvascular research.”. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, Vol. 10, No. 2, pp. 221–31, Apr. 2003. [120](#)
- [Bist 04] M. C. Biston, A. Joubert, J. F. Adam, H. Elleaume, S. Bohic, A. M. Charvet, F. Esteve, N. Foray, and J. Balosso. “Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays”. *Cancer Res*, Vol. 64, No. 7, pp. 2317–2323, 2004. [59](#)
- [Blan 04] J. M. Bland and D. G. Altman. “The logrank test.”. *BMJ (Clinical research ed.)*, Vol. 328, No. 7447, p. 1073, May 2004. [151](#)
- [Blan 97] D. Blanc and G. Portal. *Physique nucléaire*. 1997. [28](#)
- [Blee 12] F. E. Bleeker, R. J. Molenaar, and S. Leenstra. “Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma.”. *Journal of neuro-oncology*, Vol. 108, No. 1, pp. 11–27, May 2012. [9](#)
- [Bobo 94] R. H. Bobo, D. W. Laske, A. Akbasak, P. F. Morrison, R. L. Dedrick, and E. H. Oldfield. “Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain.”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91, No. 6, pp. 2076–80, March 1994. [14](#), [233](#)
- [Boby 12] L. Bobyk, M. Edouard, P. Deman, J. Rousseau, J.-F. Adam, J.-L. Ravanat, F. Estève, J. Balosso, R. F. Barth, and H. Elleaume. “Intracerebral delivery of Carboplatin in combination with either 6 MV Photons or monoenergetic synchrotron X-rays are equally efficacious for treatment of the F98 rat glioma.”. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, Vol. 31, No. 1, p. 78, Jan. 2012. [59](#)
- [Boby 13] L. Bobyk, M. Edouard, P. Deman, M. Vautrin, K. Pernet-Gallay, J. Delaroche, J.-F. Adam, F. Estève, J.-L. Ravanat, and H. Elleaume. “Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment”. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2013. [64](#), [65](#), [231](#), [233](#)

- [Bonn 06] J. A. Bonner, P. M. Harari, J. Giralt, N. Azarnia, D. M. Shin, R. B. Cohen, C. U. Jones, R. Sur, D. Raben, J. Jassem, R. Ove, M. S. Kies, J. Baselga, H. Youssoufian, N. Amellal, E. K. Rowinsky, and K. K. Ang. "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck." *The New England journal of medicine*, Vol. 354, No. 6, pp. 567–78, March 2006. [20](#)
- [Bouc 06] D. Boucher, I. Testard, and D. Averbeck. "Low levels of clustered oxidative DNA damage induced at low and high LET irradiation in mammalian cells." *Radiation and environmental biophysics*, Vol. 45, No. 4, pp. 267–76, Nov. 2006. [37](#)
- [Boud 05] C. Boudou, J. Balosso, F. Esteve, and H. Elleaume. "Monte Carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours". *Phys Med Biol*, Vol. 50, No. 20, pp. 4841–4851, 2005. [57](#), [58](#)
- [Brau 10] E. Bräuer-Krisch, R. Serduc, E. A. Siegbahn, G. Le Duc, Y. Prezado, A. Bravin, H. Blattmann, and J. A. Laissue. "Effects of pulsed, spatially fractionated, microscopic synchrotron X-ray beams on normal and tumoral brain tissue." *Mutation research*, Vol. 704, No. 1-3, pp. 160–6, 2010. [19](#)
- [Brid 07] J.-L. Bridot, A.-C. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Josserand, J.-L. Coll, L. V. Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat, and O. Tillement. "Hybrid gadolinium oxide nanoparticles : multimodal contrast agents for in vivo imaging." *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 129, No. 16, pp. 5076–84, Apr. 2007. [84](#)
- [Brid 09] J.-L. Bridot, D. Dayde, C. Rivière, C. Mandon, C. Billotey, S. Lerondel, R. Sabattier, G. Cartron, A. Le Pape, G. Blondiaux, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, and O. Tillement. "Hybrid gadolinium oxide nanoparticles combining imaging and therapy". *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 19, No. 16, p. 2328, 2009. [84](#)
- [Burk 99] W. Burkart, T. Jung, and G. Frasc. "Damage pattern as a function of radiation quality and other factors." *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, Vol. 322, No. 2-3, pp. 89–101, 1999. [36](#)
- [Burt 02] E. C. Burton, K. R. Lamborn, B. G. Feuerstein, M. Prados, J. Scott, P. Forsyth, S. Passe, R. B. Jenkins, and K. D. Aldape. "Genetic Aberrations Defined by Comparative Genomic Hybridization Distinguish Long-Term from Typical Survivors of Glioblastoma". *Cancer Res.*, Vol. 62, No. 21, pp. 6205–6210, Nov. 2002. [9](#)
- [Butt 08] K. T. Butterworth, J. A. Wyer, M. Brennan-Fournet, C. J. Latimer, M. B. Shah, F. J. Currell, and D. G. Hirst. "Variation of strand break yield for plasmid DNA irradiated with high-Z metal nanoparticles." *Radiation research*, Vol. 170, No. 3, pp. 381–7, Sep. 2008. [73](#)
- [Butt 12] K. T. Butterworth, S. J. McMahon, F. J. Currell, and K. M. Prise. "Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization." *Nanoscale*, Vol. 4, No. 16, pp. 4830–8, Aug. 2012. [132](#)
- [Cair 98] J. G. Cairncross, K. Ueki, M. C. Zlatescu, D. K. Lisle, D. M. Finkelstein, R. R. Hammond, J. S. Silver, P. C. Stark, D. R. Macdonald, Y. Ino, D. A. Ramsay, and D. N. Louis. "Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas." *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 90, No. 19, pp. 1473–9, Oct. 1998. [9](#)

- [Call 79] H. H. Callisen, A. Norman, and F. H. Adams. "Absorbed dose in the presence of contrast agents during pediatric cardiac catheterization." *Medical physics*, Vol. 6, No. 6, pp. 504–9, 1979. [1](#), [55](#)
- [Cant 12] I. Canton and G. Battaglia. "Endocytosis at the nanoscale." *Chemical Society reviews*, Vol. 41, No. 7, pp. 2718–39, Apr. 2012. [67](#), [105](#)
- [Cart 07] J. D. Carter, N. N. Cheng, Y. Qu, G. D. Suarez, and T. Guo. "Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures." *The journal of physical chemistry. B*, Vol. 111, No. 40, pp. 11622–5, Oct. 2007. [73](#)
- [Chan 08] M.-Y. Chang, A.-L. Shiau, Y.-H. Chen, C.-J. Chang, H. H.-W. Chen, and C.-L. Wu. "Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice." *Cancer science*, Vol. 99, No. 7, pp. 1479–84, July 2008. [62](#), [63](#)
- [Chat 10] N. Chattopadhyay, Z. Cai, J.-P. Pignol, B. Keller, E. Lechtman, R. Bendayan, and R. M. Reilly. "Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer." *Molecular pharmacology*, Vol. 7, No. 6, pp. 2194–206, Dec. 2010. [69](#)
- [Chau 11] A. Chaudhuri, G. Battaglia, and R. Golestanian. "The effect of interactions on the cellular uptake of nanoparticles." *Physical biology*, Vol. 8, No. 4, p. 046002, Aug. 2011. [68](#), [121](#), [230](#)
- [Chit 09] D. B. Chithrani. "Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures." *Molecular membrane biology*, Vol. 27, No. 7, pp. 299–311, Oct. 2009. [67](#), [121](#), [230](#)
- [Chit 10a] D. B. Chithrani. "Nanoparticles for improved therapeutics and imaging in cancer therapy." *Recent patents on nanotechnology*, Vol. 4, No. 3, pp. 171–80, Nov. 2010. [71](#)
- [Chit 10b] D. B. Chithrani, M. Dunne, J. Stewart, C. Allen, and D. A. Jaffray. "Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier." *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, Vol. 6, No. 1, pp. 161–9, Feb. 2010. [105](#)
- [Cloe 97] P. Cloetens, J. P. Guigay, C. De Martino, J. Baruchel, and M. Schlenker. "Fractional Talbot imaging of phase gratings with hard x rays." *Optics Letters*, Vol. 22, No. 14, p. 1059, July 1997. [202](#)
- [Coll] G. Collin. "Chapitre 7 : Les solutions". [181](#)
- [Cord 04] S. Corde, A. Joubert, J. F. Adam, A. M. Charvet, J. F. Le Bas, F. Esteve, H. El-leaume, and J. Balosso. "Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity enhancement following photoelectric effect on stable iodinated compounds". *Br J Cancer*, Vol. 91, No. 3, pp. 544–551, 2004. [58](#)
- [Corn 87] M. N. Cornforth and J. S. Bedford. "A Quantitative Comparison of Potentially Lethal Damage Repair and the Rejoining of Interphase Chromosome Breaks in Low Passage Normal Human Fibroblasts". May 1987. [43](#)
- [Coul 12] J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, L. E. Taggart, G. R. Dickson, S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, C. Trainor, A. R. Hounsell, J. M. O'Sullivan, G. Schettino, F. J. Currell, D. G. Hirst, and K. M. Prise. "Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles." *International journal of nanomedicine*, Vol. 7, pp. 2673–85, Jan. 2012. [66](#)

- [Coun 98] C. Counsell and R. Grant. "Incidence studies of primary and secondary intracranial tumors : A systematic review of their methodology and results". *Journal of Neuro-Oncology*, Vol. 37, No. 3, pp. 241–250, 1998. [8](#)
- [Cout 32] H. Coutard. "Roentgen therapy of epitheliomas of the tonsillar region, hypopharynx, and larynx from 1920 to 1926.". *Am J Roentgenol*, Vol. 28, pp. 313–331, 1932. [17](#)
- [Cumm 07] G. Cumming, F. Fidler, and D. L. Vaux. "Error bars in experimental biology.". *The Journal of cell biology*, Vol. 177, No. 1, pp. 7–11, Apr. 2007. [90](#), [91](#)
- [Deha 07] C. Dehay and H. Kennedy. "Cell-cycle control and cortical development.". *Nature reviews. Neuroscience*, Vol. 8, No. 6, pp. 438–50, June 2007. [39](#)
- [Delo 13] R. Delorme. *Radiothérapie par Photoactivation de Nanoparticules : Modélisation à l'Echelle Sub-Micrométrique et Comparaison Expérimentale*. PhD thesis, Université Paris Sud, 2013. [128](#), [130](#), [131](#), [133](#), [134](#), [135](#), [136](#), [137](#), [139](#), [233](#)
- [Deut 05] E. Deutsch and F. Huguet. "Modulation biologique de la radiothérapie : perspectives". *Bull Cancer*, Vol. 92, No. 1, pp. 90–6, 2005. [20](#)
- [Diko 93] E. Dikomey and J. Lorenzen. "Saturated and unsaturated repair of DNA strand breaks in CHO cells after X-irradiation with doses ranging from 3 to 90 Gy.". *International journal of radiation biology*, Vol. 64, No. 6, pp. 659–67, Dec. 1993. [43](#)
- [Diko 98] E. Dikomey, J. Dahm-Daphi, I. Brammer, R. Martensen, and B. Kaina. "Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines.". *International journal of radiation biology*, Vol. 73, No. 3, pp. 269–78, March 1998. [37](#)
- [Du 12] K. Du, J. A. Liddle, and A. J. Berglund. "Three-dimensional real-time tracking of nanoparticles at an oil-water interface.". *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, Vol. 28, No. 25, pp. 9181–8, June 2012. [97](#)
- [Dubo 98] F. Dubois. "Reconstruction des images tomographiques par rétroprojection filtrée". *Revue de l'ACOMEN*, Vol. 4, No. 2, 1998. [51](#), [52](#)
- [Duca 06] M. Ducasse and M. A. Brown. "Epigenetic aberrations and cancer.". *Molecular cancer*, Vol. 5, p. 60, Jan. 2006. [37](#)
- [Edou 10] M. Edouard. *Dosimétrie pour la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron : D'une vision macroscopique aux considérations microscopiques des dépôts d'énergie*. PhD thesis, Université Joseph Fourier Grenoble, 2010. [19](#), [55](#)
- [El D 93] W. El-Deiry. "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression". *Cell*, Vol. 75, No. 4, pp. 817–825, Nov. 1993. [20](#)
- [Elle 02] H. Elleaume, A. M. Charvet, S. Corde, F. Estève, and J. F. Le Bas. "Performance of computed tomography for contrast agent concentration measurements with monochromatic x-ray beams : comparison of K-edge versus temporal subtraction.". *Physics in medicine and biology*, Vol. 47, No. 18, pp. 3369–85, Sep. 2002. [192](#), [195](#)
- [Foka 09] E. Fokas, G. Kraft, H. An, and R. Engenhart-Cabillic. "Ion beam radiobiology and cancer : time to update ourselves.". *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1796, No. 2, pp. 216–29, Dec. 2009. [22](#)
- [Folk 71] J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams. "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.". *The Journal of experimental medicine*, Vol. 133, No. 2, pp. 275–88, Feb. 1971. [20](#)

- [Four 03] E. Fournier, C. Passirani, C. Montero-Menei, N. Colin, P. Breton, S. Sagodira, P. Menei, and J.-P. Benoit. "Therapeutic effectiveness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats.". *Cancer*, Vol. 97, No. 11, pp. 2822–9, June 2003. [82](#)
- [Four 04] C. Fournier and G. Taucher-Scholz. "Radiation induced cell cycle arrest : an overview of specific effects following high-LET exposure.". *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Vol. 73 Suppl 2, pp. S119–22, Dec. 2004. [22](#)
- [Gao 05] H. Gao, W. Shi, and L. B. Freund. "Mechanics of receptor-mediated endocytosis.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102, No. 27, pp. 9469–74, July 2005. [68](#), [121](#)
- [Gerw 01] L. Gerward, N. Guilbert, K. Bjørn Jensen, and H. Levring. "X-ray absorption in matter. Reengineering XCOM". *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 60, No. 1-2, pp. 23–24, Jan. 2001. [27](#)
- [Good 82] D. T. Goodhead. "An Assessment of the Role of Microdosimetry in Radiobiology". May 1982. [43](#)
- [Good 94] D. T. Goodhead. "Initial events in the cellular effects of ionizing radiations : clustered damage in DNA.". *International journal of radiation biology*, Vol. 65, No. 1, pp. 7–17, Jan. 1994. [37](#)
- [Good 99] D. T. Goodhead. "Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations.". *Journal of radiation research*, Vol. 40 Suppl, pp. 1–13, Dec. 1999. [35](#)
- [Gorl 08] T. Gorlia, M. J. van den Bent, M. E. Hegi, R. O. Mirimanoff, M. Weller, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, K. Belanger, A. A. Brandes, A. Allgeier, D. Lacombe, and R. Stupp. "Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma : prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3.". *The lancet oncology*, Vol. 9, No. 1, pp. 29–38, Jan. 2008. [17](#)
- [Grab 95] K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer, and M. J. Natan. "Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers". *Analytical Chemistry*, Vol. 67, No. 4, pp. 735–743, Feb. 1995. [85](#)
- [Gran 08] P. V. Granton, S. I. Pollmann, N. L. Ford, M. Drangova, and D. W. Holdsworth. "Implementation of dual- and triple-energy cone-beam micro-CT for postreconstruction material decomposition". *Medical Physics*, Vol. 35, No. 11, p. 5030, Oct. 2008. [184](#)
- [Hain 04] J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz. "The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice.". *Physics in medicine and biology*, Vol. 49, No. 18, pp. N309–15, Sep. 2004. [3](#), [61](#), [62](#), [63](#), [64](#), [132](#)
- [Hain 12] J. F. Hainfeld, H. M. Smilowitz, M. J. O'Connor, F. A. Dilmanian, and D. N. Slatkin. "Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice.". *Nanomedicine (London, England)*, Dec. 2012. [65](#), [132](#), [233](#)
- [Hana 11] D. Hanahan and R. A. Weinberg. "Hallmarks of cancer : the next generation.". *Cell*, Vol. 144, No. 5, pp. 646–74, March 2011. [9](#)
- [Hann 00] N. N. Hanna, S. Seetharam, H. J. Mauceri, M. A. Beckett, N. T. Jaskowiak, R. M. Salloum, D. Hari, M. Dhanabal, R. Ramchandran, R. Kalluri, V. P. Sukhatme, D. W. Kufe, and R. R. Weichselbaum. "Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation.". *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, Vol. 6, No. 5, pp. 287–93, 2000. [20](#)

- [Hegi 04] M. E. Hegi. “Clinical Trial Substantiates the Predictive Value of O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation in Glioblastoma Patients Treated with Temozolomide”. *Clinical Cancer Research*, Vol. 10, No. 6, pp. 1871–1874, March 2004. [16](#)
- [Hoan 04] K. Hoang-Xuan and A. C. Carpentier. “Immunothérapie des gliomes malins.”. In : Masson, Ed., *Tumeurs cérébrales. Du diagnostic au traitement.*, pp. 121–128, Paris, 2004. [9](#)
- [Hoff 80] H. J. Hoffman, L. Becker, and M. A. Craven. “A clinically and pathologically distinct group of benign brain stem gliomas.”. *Neurosurgery*, Vol. 7, No. 3, pp. 243–8, Sep. 1980. [9](#)
- [Hubb] J. H. Hubbell and S. M. Seltzer. “Tables of x-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients”. [180](#)
- [Hubb 06] J. H. Hubbell. “Review and history of photon cross section calculations.”. *Physics in medicine and biology*, Vol. 51, No. 13, pp. R245–62, July 2006. [179](#)
- [Hubb 99] J. H. Hubbell. “Review of photon interaction cross section data in the medical and biological context.”. *Physics in medicine and biology*, Vol. 44, No. 1, pp. R1–R22, Jan. 1999. [27](#)
- [Ilia 91] G. Iliakis. “The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells.”. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Vol. 13, No. 12, pp. 641–8, Dec. 1991. [37](#)
- [Inst 08] I. Institut Universitaire de radiophysique appliquée and H. Haute école cantonale vaudoise de la santé, Eds. *Cours de radiophysique médicale : tomodensitométrie*. Lausanne, 2008. [50](#), [53](#)
- [Iyer 06] A. K. Iyer, G. Khaled, J. Fang, and H. Maeda. “Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting.”. *Drug discovery today*, Vol. 11, No. 17-18, pp. 812–8, Sep. 2006. [13](#), [14](#)
- [Jain 10] S. Jain, J. A. Coulter, A. R. Hounsell, K. T. Butterworth, S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, G. R. Dickson, K. M. Prise, F. J. Currell, J. M. O’Sullivan, and D. G. Hirst. “Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies.”. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Vol. 79, No. 2, pp. 531–9, Feb. 2010. [71](#), [132](#), [138](#), [140](#)
- [Jena 12] P. Jena, S. Mohanty, R. Mallick, B. Jacob, and A. Sonawane. “Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells.”. *International journal of nanomedicine*, Vol. 7, pp. 1805–18, Jan. 2012. [3](#), [66](#), [118](#), [119](#), [231](#)
- [John 07] T. R. C. Johnson, B. Krauss, M. Sedlmair, M. Grasruck, H. Bruder, D. Morhard, C. Fink, S. Weckbach, M. Lenhard, B. Schmidt, T. Flohr, M. F. Reiser, and C. R. Becker. “Material differentiation by dual energy CT : initial experience.”. *European radiology*, Vol. 17, No. 6, pp. 1510–7, June 2007. [183](#)
- [Khok 85] A. R. Khokhar, I. H. Krakoff, M. P. Hacker, and J. J. McCormack. “The synthesis and antitumor properties of a series of water soluble carboxylato-(1,2-diaminocyclohexane) platinum(II) complexes”. *Inorganica Chimica Acta*, Vol. 108, No. 1, pp. 63–66, Sep. 1985. [58](#)

- [Kim 12] J.-K. Kim, S.-J. Seo, H.-T. Kim, K.-H. Kim, M.-H. Chung, K.-R. Kim, and S.-J. Ye. “Enhanced proton treatment in mouse tumors through proton irradiated nanoradiator effects on metallic nanoparticles.”. *Physics in medicine and biology*, Vol. 57, No. 24, pp. 8309–23, Dec. 2012. [62](#), [63](#)
- [Ko 80] L.-w. Ko and A. Koestner. “Morphologic and Morphometric Analyses of Butyrate-Induced Alterations of Rat Glioma Cells In Vitro”. *J Natl Cancer Inst*, Vol. 65, No. 5, pp. 1017–1027, Nov. 1980. [82](#)
- [Kong 08] T. Kong, J. Zeng, X. Wang, X. Yang, J. Yang, S. McQuarrie, A. McEwan, W. Roa, J. Chen, and J. Z. Xing. “Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles.”. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, Vol. 4, No. 9, pp. 1537–43, Sep. 2008. [71](#), [72](#), [120](#)
- [Krau 79] M. O. Krause. “Atomic radiative and radiationless yields for K and L shells”. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, Vol. 8, No. 2, p. 307, Apr. 1979. [32](#)
- [Le D 00] G. Le Duc, S. Corde, H. Elleaume, F. Estève, A. M. Charvet, T. Brochard, S. Fiedler, A. Collomb, J.-F. Le Bas, and J. Equipe RSRM -. “Feasibility of synchrotron radiation computed tomography on rats bearing glioma after iodine or gadolinium injection”. *European Radiology*, Vol. 10, No. 9, pp. 1487–1492, Aug. 2000. [198](#)
- [Le D 11] G. Le Duc, I. Miladi, C. Alric, P. Mowat, E. Bräuer-Krisch, A. Bouchet, E. Khalil, C. Billotey, M. Janier, F. Lux, T. Epicier, P. Perriat, S. Roux, and O. Tillement. “Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles.”. *ACS nano*, Vol. 5, No. 12, pp. 9566–74, Dec. 2011. [64](#), [65](#)
- [Lech 11] E. Lechtman, N. Chattopadhyay, Z. Cai, S. Mashouf, R. Reilly, and J. P. Pignol. “Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location.”. *Physics in medicine and biology*, Vol. 56, No. 15, pp. 4631–47, Aug. 2011. [133](#), [135](#), [136](#)
- [Lehm 81] L. A. Lehmann. “Generalized image combinations in dual KVP digital radiography”. *Medical Physics*, Vol. 8, No. 5, p. 659, Sep. 1981. [179](#)
- [Leun 11] M. K. K. Leung, J. C. L. Chow, B. D. Chithrani, M. J. G. Lee, B. Oms, and D. A. Jaffray. “Irradiation of gold nanoparticles by x-rays : Monte Carlo simulation of dose enhancements and the spatial properties of the secondary electrons production”. *Medical Physics*, Vol. 38, No. 2, p. 624, Jan. 2011. [133](#), [136](#)
- [Lewi 10] D. J. Lewis, C. Bruce, S. Bohic, P. Cloetens, S. P. Hammond, D. Arbon, S. Blair-Reid, Z. Pikramenou, and B. Kysela. “Intracellular synchrotron nanoimaging and DNA damage/genotoxicity screening of novel lanthanide-coated nanovectors.”. *Nanomedicine (London, England)*, Vol. 5, No. 10, pp. 1547–57, Dec. 2010. [119](#), [231](#)
- [Liu 09] X. Liu, L. Yu, A. N. Primak, and C. H. McCollough. “Quantitative imaging of element composition and mass fraction using dual-energy CT : three-material decomposition.”. *Medical physics*, Vol. 36, No. 5, pp. 1602–9, May 2009. [179](#)
- [Loru 94] V. Lorusso, F. Luzzani, F. Bertani, P. Tirone, and C. de Haën. “Pharmacokinetics and tissue distribution of iomeprol in animals”. *European Journal of Radiology*, Vol. 18, No. null, pp. S13–S20, May 1994. [57](#)
- [Lux 11] F. Lux, A. Mignot, P. Mowat, C. Louis, S. Dufort, C. Bernhard, F. Denat, F. Boschetti, C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, S. Laurent, L. Vander Elst, R. Muller, L. Sancey, V. Jossierand, J.-L. Coll, V. Stupar, E. Barbier, C. Rémy, A. Broisat, C. Ghezzi, G. Le

- Duc, S. Roux, P. Perriat, and O. Tillement. "Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications." *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, Vol. 50, No. 51, pp. 12299–303, Dec. 2011. [84](#), [106](#)
- [Magd 13] Z. Magdolenova, A. R. Collins, A. Kumar, A. Dhawam, V. Stone, and M. Dusinska. "Mechanisms of Genotoxicity. Review of Recent in vitro and in vivo Studies with Engineered Nanoparticles." *Nanotoxicology*, Feb. 2013. [3](#)
- [Mata 94] K. Z. Matalka, R. F. Barth, A. E. Staubus, M. L. Moeschberger, and J. A. Coderre. "Neutron capture therapy of a rat glioma using boronophenylalanine as a capture agent." *Radiation research*, Vol. 137, No. 1, pp. 44–51, Jan. 1994. [82](#)
- [Mats 96] K. Matsukado, T. Inamura, S. Nakano, M. Fukui, R. T. Bartus, and K. L. Black. "Enhanced tumor uptake of carboplatin and survival in glioma-bearing rats by intracarotid infusion of bradykinin analog, RMP-7." *Neurosurgery*, Vol. 39, No. 1, pp. 125–33; discussion 133–4, July 1996. [15](#)
- [McMa 11] S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, G. Schettino, G. R. Dickson, A. R. Hounsell, J. M. O'Sullivan, K. M. Prise, D. G. Hirst, and F. J. Currell. "Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles." *Scientific reports*, Vol. 1, p. 18, Jan. 2011. [136](#)
- [Mesa 99] A. V. Mesa, A. Norman, T. D. Solberg, J. J. Demarco, and J. B. Smathers. "Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents." *Physics in medicine and biology*, Vol. 44, No. 8, pp. 1955–68, Aug. 1999. [56](#)
- [Mich 92] G. J. Michael. "Tissue analysis using dual energy CT." *Australasian physical & engineering sciences in medicine / supported by the Australasian College of Physical Scientists in Medicine and the Australasian Association of Physical Sciences in Medicine*, Vol. 15, No. 2, pp. 75–87, June 1992. [181](#), [184](#), [227](#)
- [Mila 12] I. Miladi, G. Le Duc, D. Kryza, A. Berniard, P. Mowat, S. Roux, J. Taleb, P. Bonazza, P. Perriat, F. Lux, O. Tillement, C. Billotey, and M. Janier. "Biodistribution of ultra small gadolinium-based nanoparticles as theranostic agent : Application to brain tumors." *Journal of biomaterials applications*, July 2012. [84](#)
- [Mogh 02] S. M. Moghimi and H. M. Patel. "Modulation of murine liver macrophage clearance of liposomes by diethylstilbestrol. The effect of vesicle surface charge and a role for the complement receptor Mac-1 (CD11b/CD18) of newly recruited macrophages in liposome recognition." *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, Vol. 78, No. 1-3, pp. 55–65, Jan. 2002. [69](#)
- [Mogh 05] S. M. Moghimi, P. Symonds, J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska, and A. Szezyk. "A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity : implications for gene transfer/therapy." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, Vol. 11, No. 6, pp. 990–5, June 2005. [69](#)
- [Mont 11] V. Montana and H. Sontheimer. "Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 31, No. 13, pp. 4858–67, March 2011. [15](#)
- [Morr 94] P. F. Morrison, D. W. Laske, H. Bobo, E. H. Oldfield, and R. L. Dedrick. "High-flow microinfusion : tissue penetration and pharmacodynamics." *The American journal of physiology*, Vol. 266, No. 1 Pt 2, pp. R292–305, Jan. 1994. [14](#)

- [Mowa 11] P. Mowat, A. Mignot, W. Rima, F. Lux, O. Tillement, C. Roulin, M. Dutreix, D. Bechet, S. Huger, L. Humbert, M. Barberi-Heyob, M. Aloy, E. Armandy, C. Rodriguez-Lafrasse, G. Le Duc, S. Roux, and P. Perriat. "In Vitro Radiosensitizing Effects of Ultrasmall Gadolinium Based Particles on Tumour Cells". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 11, No. 9, pp. 7833–9, 2011. [71](#), [138](#)
- [Mull 91] E. Mullaart, P. H. Lohman, F. Berends, and J. Vijg. "DNA damage metabolism and aging." *Mutation research*, Vol. 237, No. 5-6, pp. 189–210, 1991. [36](#)
- [Nath 90] R. Nath, P. Bongiorno, P. I. Rossi, and S. Rockwell. "Enhanced IUdR radiosensitization by ²⁴¹Am photons relative to ²²⁶Ra and ¹²⁵I photons at 0.72 Gy/hr." *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Vol. 18, No. 6, pp. 1377–85, June 1990. [31](#)
- [Nel 06] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, and N. Li. "Toxic potential of materials at the nanolevel." *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 311, No. 5761, pp. 622–7, Feb. 2006. [66](#)
- [Nias 85] A. H. Nias. "Radiation and platinum drug interaction." *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, Vol. 48, No. 3, pp. 297–314, Sep. 1985. [19](#), [140](#)
- [Nikj 01] H. Nikjoo, P. O'Neill, W. E. Wilson, and D. T. Goodhead. "Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation." *Radiation research*, Vol. 156, No. 5 Pt 2, pp. 577–83, Nov. 2001. [37](#)
- [Nikj 10] H. Nikjoo and L. Lindborg. "RBE of low energy electrons and photons." *Physics in medicine and biology*, Vol. 55, No. 10, pp. R65–109, May 2010. [33](#), [133](#)
- [Norm 91] A. Norman, K. S. Iwamoto, and S. T. Cochran. "Iodinated contrast agents for brain tumor localization and radiation dose enhancement." *Investigative radiology*, Vol. 26 Suppl 1, pp. S120–1 ; discussion S125–8, Nov. 1991. [56](#)
- [Ober 05] S. Oberndorfer, M. Piribauer, C. Marosi, H. Lahrmann, P. Hitzengerger, and W. Grisold. "P450 enzyme inducing and non-enzyme inducing antiepileptics in glioblastoma patients treated with standard chemotherapy." *Journal of neuro-oncology*, Vol. 72, No. 3, pp. 255–60, May 2005. [15](#)
- [Oelc 96] S. Oelckers and W. Graeff. "In situ measurement of iron overload in liver tissue by dual-energy methods" *Physics in medicine and biology*, Vol. 41, No. 7, pp. 1149–65, July 1996. [192](#)
- [Ogat 05] T. Ogata, T. Teshima, K. Kagawa, Y. Hishikawa, Y. Takahashi, A. Kawaguchi, Y. Suzumoto, K. Nojima, Y. Furusawa, and N. Matsuura. "Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells". *Cancer Res*, Vol. 65, No. 1, pp. 113–120, 2005. [23](#)
- [Pawl 04] T. M. Pawlik and K. Keyomarsi. "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy." *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Vol. 59, No. 4, pp. 928–42, July 2004. [40](#)
- [Penh 10] M. A. H. du Penhoat, B. Fayard, F. Abel, A. Touati, F. Gobert, I. Despiney-Bailly, M. Ricoul, L. Sabatier, D. L. Stevens, M. A. Hill, D. T. Goodhead, and A. Chetoui. "Lethal Effect of Carbon K-Shell Photoionizations in Chinese Hamster V79 Cell Nuclei : Experimental Method and Theoretical Analysis". Apr. 2010. [35](#)
- [Peru 08] O. P. Perumal, R. Inapagolla, S. Kannan, and R. M. Kannan. "The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers." *Biomaterials*, Vol. 29, No. 24-25, pp. 3469–76, Jan. 2008. [68](#)

- [Pete 03] A. Peterzol, A. Bravin, P. Coan, and H. Elleaume. “Image quality evaluation of the angiography imaging system at the European synchrotron radiation facility”. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, Vol. 510, No. 1-2, pp. 45–50, Sep. 2003. [189](#)
- [Plou 04] F. Plouraboue, P. Cloetens, C. Fonta, A. Steyer, F. Lauwers, and J. P. Marc-Vergnes. “X-ray high-resolution vascular network imaging.”. *Journal of microscopy*, Vol. 215, No. Pt 2, pp. 139–48, Aug. 2004. [11](#)
- [Pone 00] V. Ponette, C. Le Péchoux, E. Deniaud-Alexandre, M. Fernet, N. Giocanti, H. Tourbez, and V. Favaudon. “Hyperfast, early cell response to ionizing radiation.”. *International journal of radiation biology*, Vol. 76, No. 9, pp. 1233–43, Sep. 2000. [41](#)
- [Puck 56] T. T. Puck and P. I. Marcus. “Action of x-rays on mammalian cells.”. *The Journal of experimental medicine*, Vol. 103, No. 5, pp. 653–66, May 1956. [41](#)
- [Puck 57] T. T. Puck, D. Morkovin, P. I. Marcus, and S. J. Cieciora. “Action of x-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissues.”. *The Journal of experimental medicine*, Vol. 106, No. 4, pp. 485–500, Oct. 1957. [93](#)
- [Qiu 10] Y. Qiu, Y. Liu, L. Wang, L. Xu, R. Bai, Y. Ji, X. Wu, Y. Zhao, Y. Li, and C. Chen. “Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods.”. *Bio-materials*, Vol. 31, No. 30, pp. 7606–19, Oct. 2010. [69](#)
- [Rahm 09] W. N. Rahman, N. Bishara, T. Ackerly, C. F. He, P. Jackson, C. Wong, R. Davidson, and M. Geso. “Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy.”. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, Vol. 5, No. 2, pp. 136–42, June 2009. [71](#)
- [Rain 11] N. G. Rainov and V. Heidecke. “Clinical development of experimental therapies for malignant glioma.”. *Sultan Qaboos University medical journal*, Vol. 11, No. 1, pp. 5–28, Feb. 2011. [8](#)
- [Rama] P. R. Ramasamy, R. Elmaghrabi, G. Halada, and M. Rafailovich. “A light scattering study of interactions of oppositely charged proteins in solution”. *MRS Proceedings*, Vol. 1061, pp. 1061–MM09–24. [120](#)
- [Regn 08] P. Régnard, E. Bräuer-Krisch, I. Tropès, J. Keyriläinen, A. Bravin, and G. Le Duc. “Enhancement of survival of 9L gliosarcoma bearing rats following intracerebral delivery of drugs in combination with microbeam radiation therapy.”. *European journal of radiology*, Vol. 68, No. 3 Suppl, pp. S151–5, Dec. 2008. [19](#)
- [Rima 13] W. Rima, L. Sancey, M.-T. Aloy, E. Armandy, G. B. Alcantara, T. Epicier, A. Malchère, L. Joly-Pottuz, P. Mowat, F. Lux, O. Tillement, B. Burdin, A. Rivoire, C. Boulé, I. Anselme-Bertrand, J. Pourchez, M. Cottier, S. Roux, C. Rodriguez-Lafrasse, and P. Perriat. “Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles.”. *Biomaterials*, Vol. 34, No. 1, pp. 195–181, Oct. 2013. [68](#), [69](#), [105](#), [107](#), [109](#), [119](#), [230](#)
- [Rose 99] J. H. Rose, A. Norman, M. Ingram, C. Aoki, T. Solberg, and A. Mesa. “First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx)”. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Vol. 45, No. 5, pp. 1127–1132, 1999. [56](#), [57](#)
- [Rous 07a] J. Rousseau. *Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l’injection intratumorale de drogues antinéoplasiques*. PhD thesis, Oct. 2007. [14](#), [15](#)

- [Rous 07b] J. Rousseau, C. Boudou, R. F. Barth, J. Balosso, F. Estève, and H. Elleaume. “Enhanced survival and cure of F98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation.”. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Vol. 13, No. 17, pp. 5195–201, Sep. 2007. [59](#)
- [Rous 10] J. Rousseau, R. F. Barth, M. Fernandez, J.-F. Adam, J. Balosso, F. Estève, and H. Elleaume. “Efficacy of intracerebral delivery of cisplatin in combination with photon irradiation for treatment of brain tumors.”. *Journal of neuro-oncology*, Vol. 98, No. 3, pp. 287–95, July 2010. [20](#)
- [Roux] P. Roux, Stephane Tillement, Olivier Billotey, Claire Coll, Jean-Luc Duc, Geraldine Le Marquette, Christophe A. Perriat. “Multifunctional nanoparticles : from the detection of biomolecules to the therapy”. [64](#), [65](#)
- [Ruiz 94] J. M. Ruiz de Almodóvar, M. I. Núñez, T. J. McMillan, N. Olea, C. Mort, M. Villalobos, V. Pedraza, and G. G. Steel. “Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines : a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity.”. *British journal of cancer*, Vol. 69, No. 3, pp. 457–62, March 1994. [38](#)
- [Sant 83] R. Santos Mello, H. Callisen, J. Winter, A. R. Kagan, A. Norman, and R. S. Mello. “Radiation dose enhancement in tumors with iodine”. *Medical Physics*, Vol. 10, No. 1, pp. 75–8, Jan. 1983. [2](#), [55](#), [56](#), [57](#)
- [Schu 12] G. Schulz, C. Waschkies, F. Pfeiffer, I. Zanette, T. Weitkamp, C. David, and B. Müller. “Multimodal imaging of human cerebellum - merging X-ray phase microtomography, magnetic resonance microscopy and histology.”. *Scientific reports*, Vol. 2, p. 826, Jan. 2012. [223](#)
- [Sinc 66] W. K. Sinclair and R. A. Morton. “X-Ray Sensitivity during the Cell Generation Cycle of Cultured Chinese Hamster Cells”. May 1966. [39](#)
- [Sinc 68] W. K. Sinclair. “Cyclic X-Ray Responses in Mammalian Cells in Vitro”. May 1968. [39](#)
- [Sole 07] V. Solé, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter, and J. Susini. “A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra”. *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy*, Vol. 62, No. 1, pp. 63–68, Jan. 2007. [98](#)
- [Stup 05] R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. B. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R. O. Mirimanoff. “Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.”. *The New England journal of medicine*, Vol. 352, No. 10, pp. 987–96, March 2005. [16](#)
- [Stup 09a] R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, and R. O. Mirimanoff. “Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial”. *Lancet Oncol*, Vol. 10, No. 5, pp. 459–466, 2009. [1](#), [229](#)
- [Stup 09b] R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. B. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gi-

- jtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, and R.-O. Mirimanoff. "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.". *The lancet oncology*, Vol. 10, No. 5, pp. 459–66, May 2009. [16](#), [17](#)
- [Sun 06] S. X. Sun and D. Wirtz. "Mechanics of enveloped virus entry into host cells.". *Biophysical journal*, Vol. 90, No. 1, pp. L10–2, Jan. 2006. [68](#)
- [Talb 80] A. J. Talbert, R. A. Brooks, and D. G. Morgenthaler. "Optimum energies for dual-energy computed tomography.". *Physics in medicine and biology*, Vol. 25, No. 2, pp. 261–9, March 1980. [182](#)
- [Tera 63] T. Terasima and L. J. Tolmach. "Variations in several responses of HeLa cells to x-irradiation during the division cycle.". *Biophysical journal*, Vol. 3, pp. 11–33, Jan. 1963. [39](#)
- [Tobi 82] C. Tobias, E. Blakely, E. Alpen, J. Castro, E. Ainsworth, S. Curtis, F. Ngo, A. Rodriguez, R. Roots, T. Tenford, and T. Yang. "Molecular and cellular radiobiology of heavy ions". *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, Vol. 8, No. 12, pp. 2109–2120, Dec. 1982. [21](#)
- [Tori 03] M. Torikoshi, T. Tsunoo, M. Sasaki, M. Endo, Y. Noda, Y. Ohno, T. Kohno, K. Hyodo, K. Uesugi, and N. Yagi. "Electron density measurement with dual-energy x-ray CT using synchrotron radiation.". *Physics in medicine and biology*, Vol. 48, No. 5, pp. 673–85, March 2003. [179](#), [180](#)
- [Tubi 08] M. Tubiana, A. Dietrich, M. Bourguignon, M. Cassiman, J.-M. Cosset, V. Favau-don, M. Gardès-Albert, T. Girinski, P. Gourmelon, S. Helfre, E. Lartigau, R. Masse, A. Wambersie, J. Bourhis, D. Averbeck, and J. Dutreix. *Radiobiologie : radiothérapie et radioprotection*. Paris, hermann Ed., 2008. [38](#)
- [Turk 86] J. Turkevich, R. J. Miner, and L. Babenkova. "Further studies on the synthesis of finely divided platinum". *J. Phys. Chem. ; (United States)*, Vol. 90 :20, Sep. 1986. [85](#)
- [Tzli 04] S. Tzli, M. Deserno, W. M. Gelbart, and A. Ben-Shaul. "A statistical-thermodynamic model of viral budding.". *Biophysical journal*, Vol. 86, No. 4, pp. 2037–48, Apr. 2004. [68](#), [121](#)
- [Vile 06] M. M. Vilenchik and A. G. Knudson. "Radiation dose-rate effects, endogenous DNA damage, and signaling resonance.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 103, No. 47, pp. 17874–9, Nov. 2006. [39](#)
- [Vine 86] H. J. Vinegar and S. L. Wellington. "Method of imaging the atomic number of a sample". 1986. [177](#)
- [Vine 87] H. J. Vinegar and S. L. Wellington. "Tomographic imaging of three-phase flow experiments". *Review of Scientific Instruments*, Vol. 58, No. 1, p. 96, Jan. 1987. [180](#), [181](#)
- [Walk 78] M. D. Walker, E. Alexander, W. E. Hunt, C. S. MacCarty, M. S. Mahaley, J. Mealey, H. A. Norrell, G. Owens, J. Ransohoff, C. B. Wilson, E. A. Gehan, and T. A. Strike. "Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial.". *Journal of neurosurgery*, Vol. 49, No. 3, pp. 333–43, Sep. 1978. [16](#)

- [Wall 98] S. S. Wallace. “Enzymatic Processing of Radiation-Induced Free Radical Damage in DNA”. June 1998. [36](#)
- [Ward 88] J. F. Ward. “DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells : identities, mechanisms of formation, and reparability.”. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol. 35, pp. 95–125, Jan. 1988. [37](#)
- [Ward 95] J. F. Ward. “Radiation mutagenesis : the initial DNA lesions responsible.”. *Radiation research*, Vol. 142, No. 3, pp. 362–8, June 1995. [37](#)
- [Wats 01] M. A. Watson, A. Perry, V. Budhjara, C. Hicks, W. D. Shannon, and K. M. Rich. “Gene Expression Profiling with Oligonucleotide Microarrays Distinguishes World Health Organization Grade of Oligodendrogliomas”. *Cancer Res.*, Vol. 61, No. 5, pp. 1825–1829, March 2001. [9](#)
- [Weit 06] T. Weitkamp, C. David, C. Kottler, O. Bunk, and F. Pfeiffer. “Tomography with grating interferometers at low-brilliance sources”. In : U. Bonse, Ed., *Optics & Photonics*, pp. 63180S–63180S–10, Aug. 2006. [202](#)
- [Well 87] S. L. Wellington and H. J. Vinegar. “X-ray computerized tomography”. 1987. [182](#)
- [With 75] H. R. Withers. “The four Rs of radiotherapy”. *Adv. Radiat. Biol.*, Vol. 5, pp. 241–247, 1975. [18](#)
- [Xia 08] T. Xia, M. Kovoichich, M. Liong, J. I. Zink, and A. E. Nel. “Cationic polystyrene nanoparticle toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways.”. *ACS nano*, Vol. 2, No. 1, pp. 85–96, Jan. 2008. [69](#)
- [Yang 97] W. Yang, R. F. Barth, J. H. Rotaru, M. L. Moeschberger, D. D. Joel, M. M. Nawrocky, and J. H. Goodman. “Enhanced survival of glioma bearing rats following boron neutron capture therapy with blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of boronophenylalanine.”. *Journal of neuro-oncology*, Vol. 33, No. 1-2, pp. 59–70, May 1997. [150](#)
- [Yuan 10] H. Yuan, J. Li, G. Bao, and S. Zhang. “Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake.”. *Physical review letters*, Vol. 105, No. 13, p. 138101, Sep. 2010. [68](#)
- [Zane 11] I. Zanette. *Interférométrie X à réseaux pour l’imagerie et l’analyse de front d’ondes au synchrotron*. PhD thesis, Grenoble, UJF, 2011. [29](#), [202](#), [204](#)
- [Zhen 09] Y. Zheng and L. Sanche. “Gold Nanoparticles Enhance DNA Damage Induced by Anti-cancer Drugs and Radiation”. July 2009. [72](#)
- [Zulc 80] K. J. Zülch. “Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors”. *Neuroradiology*, Vol. 19, No. 2, pp. 59–66, March 1980. [8](#)

Résumé Le traitement des gliomes de haut grade constitue aujourd’hui encore un réel enjeu médical. Les techniques actuellement disponibles sont principalement palliatives et permettent d’augmenter la survie des patients de quelques mois seulement. Une technique innovante de radiothérapie consiste à renforcer la dose déposée dans la tumeur grâce à l’injection d’atomes lourds de manière spécifique dans celle-ci au préalable d’une irradiation de photons de basse énergie (50-100 *keV*). Cette technique a fait l’objet d’essais précliniques et maintenant d’essais cliniques de phases I et II sur la ligne médicale du synchrotron Européen dont le rayonnement monochromatique et intense est particulièrement adapté pour l’application. L’utilisation d’un agent de contraste (AC) iodé ($Z=53$) injecté par voie veineuse permet d’améliorer le bénéfice de la radiothérapie mais n’est cependant pas suffisante pour l’élimination complète de la tumeur. En effet, l’accumulation passive d’atomes lourds dans la tumeur n’est pas assez importante et le caractère extracellulaire d’un AC ne maximise pas l’efficacité biologique de l’irradiation. Les nanoparticules (NPs) métalliques apparaissent comme un moyen efficace pour repousser ces limites. Dans le cadre de cette thèse, des études ont été conduites sur la lignée cellulaire de gliome F98 afin de caractériser la toxicité et l’internalisation de trois types de nanoparticules différents : nanoparticules de gadolinium (GdNPs 3 *nm*), d’or (AuNPs 13 *nm*) et de platine (PtNPs 6 *nm*). La survie cellulaire a également été évaluée après différentes conditions d’irradiation de photons monochromatiques en présence de ces nano-objets. La dépendance de la réponse cellulaire à l’énergie du rayonnement incident ainsi qu’à la distribution subcellulaire des NPs a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes mis en jeu dans ce traitement. A concentration identique, les NPs diminuent la survie cellulaire de manière plus importante qu’un AC, validant ainsi l’intérêt microdosimétrique des NPs. L’effet est préférentiel à basse énergie (*keV*) indiquant que la photoactivation des atomes lourds est en partie responsable la réponse cellulaire. Par ailleurs, les GdNPs et les PtNPs se sont aussi montrées efficaces pour diminuer la survie cellulaire en combinaison à une irradiation à haute énergie (1.25 *MeV*) indiquant qu’un mécanisme de radiosensibilisation différent de la photoactivation intervient également. Les études précliniques ont montré que le recouvrement complet de la tumeur par les NPs constitue un point clé pour garantir le bénéfice thérapeutique du traitement. Dans cette optique, une méthode de tomographie à deux énergies développée au synchrotron, a été caractérisée dans le cadre de ce travail. L’étude a permis d’imager de manière quantitative et simultanée la tumeur (mise en évidence par un AC iodé) et son recouvrement par des GdNPs (injectées par voie directe) chez le rongeur porteur d’un gliome. La correspondance entre la distribution de l’AC et la tumeur a également été étudiée à l’aide de techniques d’imagerie à haute résolution (IRM, tomographie X par contraste de phase et histologie).

Abstract Gliomas treatment is still a serious challenge in medicine. Available treatments are mainly palliative and patients’ survival is increased by a few months only. An original radiotherapy technique consists in increasing the dose delivered to the tumor by loading it with high *Z* atoms before an irradiation with low energy X-rays (50-100 *keV*). Preclinical studies have been conducted using iodine contrast agent (CA) ($Z=53$) and 50 *keV* X-rays. The increase of the animals’ survival leads today to the beginning of clinical trials (phases I and II) at the medical beamline of the European synchrotron, where the available monochromatic and intense photons beam is well suited for this treatment. The use of intravenously injected CA is however insufficient for curing rat’s bearing glioma. Indeed, the contrast agent’s accumulation is limited by the presence of the BBB and it remains extracellular. Metallic nanoparticles (NPs) appear interesting for improving the treatment efficacy. During this work, three different types of NPs have been studied : GdNPs (3 *nm*), AuNPs (13 *nm*) and PtNPs (6 *nm*). Their toxicity and internalization have been evaluated in vitro on F98 rodent glioma cells. Cells’ survival has also been measured after different irradiation conditions in presence of these NPs and with monochromatic photons beams. Several mechanisms implicated in the treatment have been highlighted by the study of the cells’ response dependence to the incident particles energy and to the sub cellular NPs distribution during irradiation. For identical concentrations, NPs were more efficient in cells killing than CA, illustrating their microdosimetric potential. The effect was also preferential for low energy X-rays, indicating that photoactivation of heavy atoms plays a role in the cells’ death. GdNPs and PtNPs have also lead to an effect in combination to high energy photons (1.25 *MeV*), indicating that another mechanism may also increase the cell sensitivity to radiations with such NPs. Preclinical trials, performed on rats bearing F98 glioma, have shown that the complete tumor’s overlap with NPs is a key point for the success of this treatment. Dual energy computed tomography (CT) has been developed at the synchrotron medical beamline and evaluated during this PhD thesis. The study has allowed quantitatively and simultaneously imaging the tumor (highlighted by iodinated CA) and the GdNPs distribution injected intracerebrally in rodents bearing glioma. The comparison between the CA distribution and the tumor’s volume has also been performed using high spatial resolutions imaging methods (MRI, X-rays phase contrast tomography and histology).